

Identifizierung der Biofilm Komponente Cellulose und Analyse der Curli-Fimbrien Expression bei Enterobakterien

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Khavit Zogaj
aus Terpeze/Kosovo

1. Referent: _____ Prof. Dr. Jürgen Wehland

2. Referent: _____ Prof. Dr. Dieter Jahn

eingereicht am: _____ 17 Juni 2004

mündliche Prüfung (Disputation) am: _____ 6 September 2004

2004

(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Prof. Dr. Jürgen Wehland, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Veröffentlichungen

Xhavit Zogaj, Manfred Nimtz, Manfred Rohde, Werner Bokranz and Ute Römling. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol* 2001. Vol 39:1452–1463.

Xhavit Zogaj, Werner Bokranz, Manfred Nimtz and Ute Römling. Production of Cellulose and Curli Fimbriae by Members of the Family *Enterobacteriaceae* Isolated from the Human Gastrointestinal Tract. *Infec. and Immunity* 2003. Vol 71 No. 7: 4151–4158

Ute Römling, Werner Bokranz, Wolfgang Rabsch, **Xhavit Zogaj**, Manfred Nimtz und Helmut Tschäpe. Occurrence and regulation of the multizellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int. J. Med. Microbiol.* 2003. Vol 293: 273-285.

Buchbeitrag

Ute Römling, Werner Bokranz, Ulrich Gerstel, Heinrich Lünsdorf, Manfred Nimtz, Wolfgang Rabsch, Helmut Tschäpe, **Xhavit Zogaj**. Dissection of the Genetic Pathway Leading to Multizellular Behaviour in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium and other *Enterobacteriaceae*. 2003. p. 231–261. In M. Wilson and D. Devine (ed.), Medical implications of biofilms. Cambridge University Press, Cambridge, England.

Posterpresentation

Xhavit Zogaj, Manfred Nimtz, Manfred Rohde, Werner Bokranz and Ute Römling. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* produce cellulose. VAAM-Tagungen: 01 - 03 Oktober 2001, Osnabrück.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
I.1. Biofilm.....	1
I.1.1. Biofilmbildung bei Enterobakterien.....	2
I.1.2. Vier charakteristische Morphotypen von <i>S. Typhimurium</i>	3
I.2. Curli-Fimbrien.....	5
I.2.1. Curli-Fimbrien Operons in <i>S. Typhimurium</i>	5
I.3. Cellulose.....	6
I.3.1. Cellulose Biosynthese.....	8
I.3.2. Cellulose Biosynthese bei Pflanzen.....	9
I.3.3. Cellulose Biosynthese bei <i>G. xylinus</i>	10
I.3.4. Bakterielle Cellulose.....	11
I.3.5. Die Cellulose Operons in <i>S. Typhimurium</i>	12
I.4. Ziel der Arbeit.....	13
II. Material und Methoden.....	15
II.1. Geräte.....	15
II.2. Kooperationspartner.....	16
II.3. Computerprogramme und Internetadressen.....	16
II.4. Chemikalien.....	17
II.5. Rezepte für Flüssigmedien und Agarplatten.....	17
II.5.1. Rezepte für Flüssigmedien.....	17
II.5.2. Rezepte für Agarplatten.....	17
II.6. Standardpuffer und Lösungen.....	19
II.7. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.....	21
II.8. Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	23
II.8.1. Animpfen des Mediums und Inkubationsbedingungen.....	23
II.8.1.1. Animpfen des Mediums.....	23
II.8.1.2. Inkubation unter aerophilen Bedingungen.....	23
II.8.1.3. Inkubation unter mikroaerophilen Bedingungen.....	23
II.8.2. Antibiotika.....	23
II.8.3. Herstellung von Glycerinstocks.....	24
II.8.4. Replika-Technik nach Lederberg.....	24
II.8.5. Prototrophie-Test.....	24
II.8.6. Nachweis der Katalaseaktivität.....	24
II.8.7. Biofilm Bildung.....	25
II.8.7.1. Kongorot (CR)- und Calcoflour (CF) Bindung.....	25
II.8.7.2. Pellikel Bildung.....	25
II.8.7.3. Cellulase Verdau von Bakterienaggregaten.....	25
II.8.7.4. Proteinase K Verdau von Bakterienaggregaten.....	26
II.8.7.5. Bakterielle Adhärenz an abiotische Oberflächen.....	26

II.8.8. Messung der Hydrophobizität	27
II.8.9. Glykogen-Nachweis.....	27
II.8.10. Messung der Cellulase Aktivität	28
II.8.10.1. CMC-Agar Diffusions Methode	28
II.8.10.2. Cellulase Aktivität in CMC-SDS-Polyacrylamid Gelen.....	28
II.8.11. Messung der Genexpression: β - Galaktosidasetest.....	28
II.8.12. Proteinase K Verdau ganzer Bakterienzellen.....	29
II.8.13. Permeabilisierung der Bakterienzellen.....	29
II.8.14. Cellulose-Nachweis durch Elektronenmikroskopie (EM)	30
II.8.14.1. Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	30
II.8.14.2. Die Schrägbedampfungs - Methode	30
II.8.14.3. Die Ultradünnschnitt - Methode.....	30
II.8.14.4. Die Negativ-Kontrastierungs - Methode.....	31
II.9. Biochemische Methoden zur Cellulose Detektion.....	31
II.9.1. Isolierung von Cellulose nach der Updegraff - Methode	31
II.9.2. Isolierung von Cellulose mit SDS.....	31
II.9.3. Isolierung von Cellulose mit SDS + Merkaptoethanol.....	32
II.9.4. Isolierung von Cellulose mit NaOH.....	32
II.9.5. Gaschromatographie.....	32
II.9.5.1. Benötigte Reagenzien.....	32
II.9.5.2. Derivatisierung der Monosaccharide.....	33
II.9.5.3. Trimethylsilylierung.....	33
II.9.5.4. Gaschromatographie.....	33
II.10. Methoden der Proteinanalyse.....	33
II.10.1. SDS - PAGE.....	33
II.10.1.1. Molekulargewichtsmarker.....	34
II.10.1.2. Färben von Gelen.....	34
II.10.2. Western Blotting.....	34
II.10.3. Aufreinigung polyklonaler Antikörper.....	35
II.10.4. CsgA Detektion.....	36
II.10.4.1. Anreicherung von CsgA.....	36
II.10.4.2. CsgA Detektion im Coomassiegel und mittels Western Blot.....	36
II.10.5. Sequenzierung von CsgA durch Q-TOF.....	36
II.10.5.1. Q-TOF.....	36
II.10.5.2. Aufarbeitung der Proben.....	36
II.11. Methoden der DNA - Analyse.....	37
II.11.1. Die verwendeten Kits.....	37
II.11.2. DNA – Primer.....	38
II.12. Klonierung und Herstellung von Mutanten.....	40
II.12.1. Transformation.....	40
II.12.1.1. Transformation mit chemokompetenten Zellen.....	40

II.12.1.2. Transformation mit elektrokompenten Zellen.....	40
II.12.2. Transduktion.....	41
II.12.2.1. Herstellung des Phagenlysates.....	41
II.12.2.2. Bestimmung der pfu (plaque forming unit).....	42
II.12.2.3. Test auf lytische Phagen.....	42
II.12.2.4. Test auf lysogene Phagen.....	43
II.12.3. Inaktivierung chromosomaler Gene mittels PCR-Produkten.....	43
II.12.4. Herstellung einer Inframe-Deletions Mutante.....	44
II.12.5. Qualitätskontrollen von Plasmiden.....	46
II.12.5.1. DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen.....	46
II.12.5.2. Rousconi-Test.....	46
III. Ergebnisse.....	47
III.1. Cellulose Nachweis in <i>Salmonella Typhimurium</i>.....	47
III.1.1. Nachweis des <i>bcsABZC</i> -Operons.....	47
III.1.2. Beteiligung von <i>bcsA</i> an der Expression des <i>bda</i> Morphotyps.....	48
III.1.3. Transkriptionsaktivität der <i>bcsA</i> - und <i>bcsC</i> -Gene.....	49
III.1.4. Transkriptionelle Abhängigkeit der Gene <i>bcsA</i> und <i>bcsC</i> von den Regulatoren CsgD und RpoS.....	51
III.1.5. Transkriptionelle Abhängigkeit des <i>adrA</i> -Genes von BcsA.....	51
III.1.6. Test des Morphotypes einer Doppelmutante.....	52
III.1.7. Stabilität der Bakterienaggregate gegenüber Cellulase- oder Proteinase K-Verdau.....	53
III.1.8. Glukose Nachweis durch GC / MS.....	54
III.1.9. Herstellung und Untersuchung von Glykogen Mutanten.....	55
III.1.10. Messung der Hydrophobizität der extrazellulären Matrix.....	56
III.1.11. Nachweis von Cellulose mit Hilfe von CF- Färbungen.....	57
III.1.12. Expression der Cellulose in der Minimalmedium-Kultur.....	59
III.1.13. Elektronenmikroskopische Analyse der Cellulose-Mutanten.....	60
III.1.14. Elektronenmikroskopische Analyse der isolierten Cellulose	61
III.1.15 Charakterisierung der Cellulose Operons.....	63
III.2. Funktion des BcsZ Proteins in <i>S. Typhimurium</i>.....	66
III.2.1. Herstellung einer <i>bcsZ</i> -Mutante und phenotypischer Nachweis einer Beteiligung dieses Genes in der Cellulose Biosynthese.....	66
III.2.2. Klonierung des <i>bcsZ</i> -Genes.....	67
III.2.3. Nachweis der endo-1,4- β -Glukanase Aktivität von BcsZ.....	68
III.2.4. Lokalisation des BcsZ-Proteins.....	69
III.2.5. <i>bcsZ</i> -Expression in Abhängigkeit von der Wachstumsphase.....	71
III.3. <i>E. coli</i> Tob1 exprimiert den <i>rda</i> Morphotyp.....	71
III.3.1. Herstellung einer <i>csgD</i> - und <i>bcsA</i> -Deletions Mutante in Tob1.....	72
III.3.2. GC/MS Nachweis der Cellulose, isoliert aus den Tob1- Bakterienaggregaten.....	74

III.4. Untersuchungen auf Cellulose- und Curli-Fimbrien Bildung bei diversen Fäkalisolate der Enterobakterien.....	74
III.4.1. Expression des multizellulären Morphotypes.....	74
III.4.2. Untersuchungen auf Cellulose/Curli-Fimbrien Produktion und Biofilm Bildung bei <i>C. freundii</i> Fec4 und <i>E. sakazakii</i> Fec39.....	76
III.4.3. Identifizierung des CsgA Proteins bei <i>Citrobacter spp.</i> Fec2 durch Q-Tof.....	79
III.4.4. Nachweis des <i>bcsA</i> -Genes bei diversen Enterobakterien.....	80
III.4.5. Amplifizierung und Sequenzierung der Curli-Fimbrien Gene bei diversen Enterobakterien.....	81
III.5. Analyse des Proteins BcsA.....	83
III.6. Analyse des Proteins BcsZ.....	84
III.7. Analyse des Proteins CsgA.....	85
III.8. Analyse des csg-intergenischen Regions.....	86
IV. Diskussion.....	89
IV.1. Cellulose Nachweis.....	92
IV.1.1. Cellulose Biosynthese bei Enterobakterien.....	94
IV.2. Nachweis der Funktion des BcsZ Proteins.....	95
IV.3. Phylogenie der Cellulose-woher kommt die genetische Information für Cellulose Biosynthese bei Enterobakterien.....	97
IV.4. Curli-Fimbrien.....	98
IV.5. Korrelation zwischen Phylogenie, extrazellulärer Matrix und Lebensstil bei diversen Enterobakterien.....	99
IV.6. Ausblick.....	100
V. Zusammenfassung.....	101
VI. Literatur.....	103
VII. Anhang.....	113
VIII. Danksagung.....	125
IX. Lebenslauf.....	126

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

<u>Abb. 1.</u>	Schematische Darstellung einer Biofilmbildung. Seite 1.
<u>Abb. 2.</u>	Vier charakteristischen Morphotypen von <i>S. Typhimurium</i> . Seite 3.
<u>Abb. 3.</u>	Erscheinungsformen des rdar Morphotypes. Seite 4.
<u>Abb. 4.</u>	Darstellung chemischer Bindungen der Glukose Moleküle in der Cellulose. Seite 6.
<u>Abb. 5.</u>	Schematische Darstellung der Cellulose Bildung. Seite 7.

<u>Abb. 6.</u>	Die zwei TC-Typen der Cellulose Biosynthese. Seite 8.
<u>Abb. 7.</u>	Die Struktur des CsaA Proteins. Seite 9.
<u>Abb. 8.</u>	Cellulose Synthese Komplex in <i>G. xylinus</i> . Seite 10.
<u>Abb. 9.</u>	Der Cellulose Biosynthese Weg bei <i>G. xylinus</i> . Seite 11.
<u>Abb. 10.</u>	Drei Formen des Kontaktwinkels. Seite 27.
<u>Abb. 11.</u>	Schematische Darstellung der Inaktivierung chromosomaler Gene mittels PCR- Produkten. Seite 44.
<u>Abb. 12.</u>	Schematische Darstellung der <i>bcsA</i> -Deletion in <i>S. Typhimurium</i> Stamm MAE52. Seite 48.
<u>Abb. 13.</u>	β -Galaktosidaseaktivität der <i>bcs</i> -Gene unter verschiedenen Bedingungen. Seite 50.
<u>Abb. 14.</u>	β -Galaktosidaseaktivitäten der <i>bcsA::MudJ</i> - und <i>bcsC::MudJ</i> -Fusionen in $\Delta csgD$ und $\Delta rpoS$. Seite 51.
<u>Abb. 15.</u>	β -Galaktosidaseaktivität des <i>adrA</i> Genes. Seite 52.
<u>Abb. 16.</u>	Glukose-Detektion durch GC/MS. Seite 54.
<u>Abb. 17.</u>	Glykogen-Mutanten auf Kornberg- und CR-Agarplatten. Seite 56.
<u>Abb. 18.</u>	Kontaktwinkel der <i>S. Typhimurium</i> Stämme. Seite 57.
<u>Abb. 19.</u>	Nachweis der Cellulose mit Hilfe von CF-Färbungen. Seite 58.
<u>Abb. 20.</u>	Mikroskopische Aufnahmen der mit CF gefärbten Cellulose-Fibrillen von <i>S. Typhimurium</i> MAE97. Seite 59.
<u>Abb. 21.</u>	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>S. Typhimurium</i> Bakterienaggregaten. Seite 60.
<u>Abb. 22.</u>	EM-Aufnahmen schrägbedampfter Präparate von <i>S. Typhimurium</i> . Seite 62.
<u>Abb. 23.</u>	EM-Aufnahmen aus Cellulase verdauten Proben von <i>S. Typhimurium</i> MAE196. Seite 62.
<u>Abb. 24.</u>	EM-Aufnahme von Cellulose, isoliert von <i>S. Typhimurium</i> MAE97 nach der Updegraff Methode. Seite 63.
<u>Abb. 25.</u>	Anordnung der Cellulose Operons bei <i>S. Typhimurium</i> LT2. Seite 63.
<u>Abb. 26.</u>	Überprüfung der Inaktivierung des <i>bcsZ</i> Genes durch Verdau der PCR Produkte. Seite 66.
<u>Abb. 27.</u>	Der Morphotyp einer <i>bcsZ</i> Mutante. Seite 67.
<u>Abb. 28.</u>	Restriktionsverdau des Plasmides pXZO62A. Seite 67.
<u>Abb. 29.</u>	Detektion des BcsZ Proteins im Western Blot. Seite 68.
<u>Abb. 30.</u>	Endo-1,4- β -Glucanase Aktivität von BcsZ auf CMC-Agarplatte. Seite 69.
<u>Abb. 31.</u>	Endo-1,4- β -Glucanase Aktivität von BcsZ in CMC-SDS-Polyakrylamidgel. Seite 69.
<u>Abb. 32.</u>	Detektion des BcsZ Proteins via Western Blot aus intakten und mit Proteinase K behandelten Bakterienzellen. Seite 70.
<u>Abb. 33.</u>	Detektion des BcsZ Proteins via Western Blot aus permeabilisierten und mit Proteinase K behandelten Bakterienzellen. Seite 70.
<u>Abb. 34.</u>	Detektion des BcsZ Proteins aus einer <i>S. Typhimurium</i> MAE97 Kultur in Abhängigkeit von der Wachsumsphase. Seite 71.

<u>Abb. 35.</u>	Expression des <i>rdar</i> Morphotypes bei <i>E. coli</i> Tob1. Seite 72.
<u>Abb. 36.</u>	Elektrophoretische Auftrennung der <i>csgD</i> -PCR Produkten von Tob1 und Tob2 im Agarosegel. Seite 73.
<u>Abb. 37.</u>	Elektrophoretische Auftrennung der <i>bcsA</i> -PCR Produkten von Tob1 und Tob2 im Agarosegel. Seite 73.
<u>Abb. 38.</u>	Die Morphotypen von Tob1 und seiner isogenen Mutanten auf T-Medium-CR-Agarplatte. Seite 74.
<u>Abb. 39.</u>	CR- und CF-Bindung von ausgewählten Fäkalisolaten der Enterobakterien. Seite 75.
<u>Abb. 39.</u>	Mikroskopische Aufnahmen der mit CF gefärbten Bakterienaggregate von <i>C. freundii</i> Fec4 und <i>E. sakazakii</i> Fec39. Seite 77.
<u>Abb. 41.</u>	Pellikelbildung bei <i>C. freundii</i> Fec4 und <i>E. sakazakii</i> Fec39. Seite 78.
<u>Abb. 42.</u>	Adhärenz an Glass bei <i>C. freundii</i> Fec4 und <i>E. sakazakii</i> Fec39. Seite 78.
<u>Abb. 43.</u>	Western Blot der Curli-Fimbrien Untereinheit CsgA. Seite 79.
<u>Abb. 44.</u>	Detektion des CsgA-Proteins in einem SDS-Polyakrylamidgel. Seite 80.
<u>Abb. 45.</u>	Die CsgA Proteinsequenz von <i>Citrobacter spp.</i> Fec2. Seite 80.
<u>Abb. 46.</u>	PCR-Produkt des <i>bcsA</i> Genes bei diversen Fäkalisolaten der Enterobakterien im Agarosegel. Seite 81.
<u>Abb. 47.</u>	PCR Produkt des <i>csgA</i> Genes bei diversen Fäkalisolaten der Enterobakterien im Agarosegel. Seite 82.
<u>Abb. 48.</u>	Schematische Darstellung der Curli-Fimbrien Operons. Seite 82.
<u>Abb. 49.</u>	Analyse des mittleren Bereiches des BcsA Proteins. Seite 84.
<u>Abb. 50.</u>	Das BcsZ Protein von <i>S. Typhimurium</i> LT2. Seite 85.
<u>Abb. 51.</u>	Alignment des CsgA Proteins. Seite 86.
<u>Abb. 52.</u>	Alignment der <i>csg</i> -intergenischen Region. Seite 88.
<u>Abb. 53.</u>	Regulationskaskade zur Bildung des <i>rdar</i> Morphotypes. Seite 89.
<u>Abb. 54.</u>	Phylogenetischer Baum der Cellulose Synthase verschiedener Bakterien. Seite 97.
<u>Abb. 55.</u>	Verhältnis zwischen Phylogenie, extrazellulärer Matrix und Lebensstil. Seite 99.

Tabellenverzeichnis

<u>Tab. 1. A.</u>	Liste der verwendeten Bakterienstämme. Seite 21.
<u>Tab. 1. B.</u>	Liste der verwendeten Hilfsstämme. Seite 22.
<u>Tab. 2.</u>	Liste der verwendeten Plasmide. Seite 22.
<u>Tab. 3.</u>	Liste der verwendeten Antibiotika. Seite 23.
<u>Tab. 4.</u>	Zusammensetzung von SDS-Gelen verschiedener Konzentration. Seite 33.
<u>Tab. 5.</u>	Die verwendeten Antikörper. Seite 35.
<u>Tab. 6.</u>	Liste der verwendeten Primer. Seite 38.
<u>Tab. 7.</u>	Die Homologie der Proteine YhjO, YhjM, YhjN und YhjL von <i>S. Typhimurium</i> LT2 zu den in der Cellulose Biosynthese beteiligten Proteine bei <i>G. xylinus</i> , <i>A. tumefaciens</i> und <i>R. leguminosarum</i> . Seite 47.

- Tab. 8.** -10 und -35 Box der in den Cellulose Operons befindlichen Transkriptionseinheiten. **Seite 64.**
- Tab. 9.** MudJ-Insertion in den Genen *bcsA* und *bcsC*. **Seite 65.**
- Tab. 10.** Analyse der Gene bei *S. Typhimurium* LT2. **Seite 65.**
- Tab. 11.** Die Homologie der Gene *csgD*, *csgB* und *csgA* von *Citrobacter spp.* Fec2, *C. freundii* Fec4 und *E. sakazakii* Fec39 zu *S. Typhimurium* LT2. **Seite 83.**

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AdrA	AgfD regulierter Gen A
AK	Antikörper
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumpersulfat
bcs	bacterial cellulose synthesis
bdar	brown, dry and rough.
BL	Abblocklösung
bp	Basenpaare
C-di-GMP	Cyclic di-guanosine-monophosphate
CF	Calcofluor
Cm	Chloramphenicol
CR	Kongorot
csg	curli synthesis gene
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	1,2-Bis-[2-aminoethoxyethan]-N,N,N',N' - tetraacetat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EM	Elektronenmikroskop
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
g	Gramm
h	Stunde
IM	innere Membran
kb	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton

Km	Kanamycin
LB	Luria Bertani
LT	Lilleengen Type
LT	Lilleengen Type
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Nal	Nalidixinsäure
nm	Nanometer
OD.	Optische Dichte
OM	äußere Membran
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase chain reaction
pdar	pink, dry and rough.
PVDF	Polyvinylidifluorid
rdar	red, dry and rough.
upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RPC	Reversed-Phase-Chromatographie
s.	siehe
saw	smooth and white.
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-elektrophorese
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-Puffer
TBS-T	TBS-Tween
Tc	Tetracyclin
TCA	Trichloracetat
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamid
TFA	Trifluoracetat
TOF-MS	Time Of Flight-Mass Spectroscopy
U	Units (Enzymeinheit)
Ø	Breite

I. Einleitung

I.1. Biofilm

Als Biofilm bezeichnet man die an einer Grenzfläche adhärierende und von extrazellulären Substanzen zusammengehalten Lebensgemeinschaft von Bakterien. Die Biofilmbildung wird von unterschiedlichen Faktoren induziert wie z.B. durch Nährstoffmangel [James *et al.* 1995, Gerstel und Römling 2001], Zelldichte [O'Toole 2000] oder N-Acetyl-Homoserinlaktone-Signalmoleküle (Quorum Sensing) [Pesci und Iglewski 1997, Potera 1996, De Kievit *et al.* 2001, Eberl 1999]. An der Biofilmbildung sind verschiedene proteinöse und/oder zuckerhaltige extrazelluläre Substanzen beteiligt wie z.B. Flagellen [Garret *et al.* 1999, Pringent-Combaret *et al.* 1999, Vatanyoopaisarn *et al.* 2000, Tremoulet *et al.* 2002], Typ I Pili [Pratt und Kolter 1998], LPS [Genevaux *et al.* 1999 b], Curli-Fimbrien [Olsen *et al.* 1989, Römling *et al.* 1998a], Cellulose [Solano *et al.* 2002, Prouty und Gunn 2003, diese Arbeit], Alginat [Davies und Geesey 1995, Hentzer *et al.* 2001] oder Colansäure [Solano *et al.* 2002].

In Abb. 1. ist eine mögliche Hypothese wie Biofilm entsteht schematisch dargestellt. Planktonische Bakterienzellen interagieren miteinander und/oder mit einer abiotischen oder biotischen Grenzfläche und bilden Mikrokolonien. Aus diesen Mikrokolonien entsteht dann der ausgereifte Biofilm. Der Biofilm entwickelt sich fort solange eine Nährstoffquelle in der Umgebung erhältlich ist. Wenn die Bakterien nicht ausreichend mit Nahrung versorgt werden können, dann lösen sie sich vom Biofilm ab, indem sie Enzyme ausscheiden, welche die Matrix im Nahbereich abbauen. Somit kehren sie in ihre planktonische Lebensweise zurück [O'Toole *et al.* 2000].

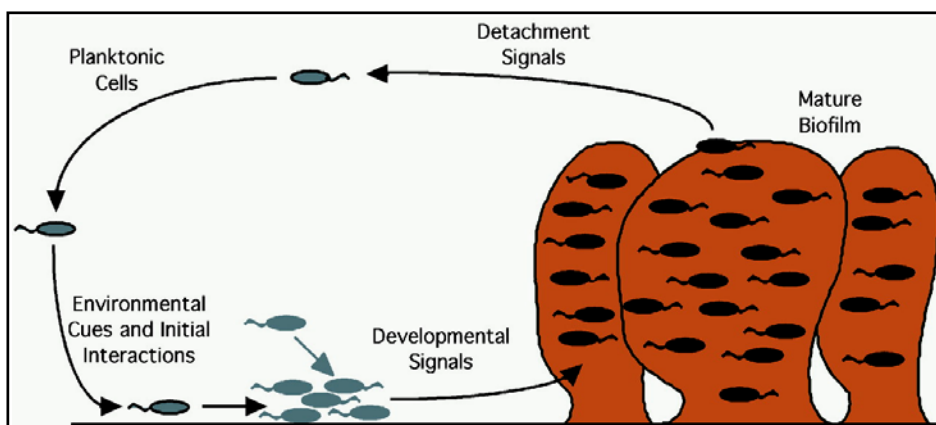


Abb. 1. Schematische Darstellung einer Biofilmbildung (aus O'Toole *et al.* 2000).

Die Biofilme werden aus verschiedenen Bakterienarten oder aus Bakterien derselben Art gebildet. Während die Biofilme, die sich aus verschiedenen Bakterienarten

zusammensetzen vorwiegend in der Umwelt vorkommen [O'Toole *et al.* 2000], sind Biofilme, die sich aus ein und derselben Bakterienart bestehen überwiegend im klinischen Bereich zu finden, wie z.B. in Implantate [Archibald und Gaynes 1997, Dickinson und Bisno 1993] oder bei Patienten mit Cystischer Fibrose [Coleman *et al.* 2003, Kresse *et al.* 2003]. In der Umwelt bieten Biofilme den Bakterien Schutz gegen Strömungseffekte und zum anderen ermöglicht die Biofilmbildung das dauerhafte Anheften an günstigen Lebensräumen, in denen die Bakterien dann mit Nährstoffen versorgt werden [Costerton *et al.* 1995]. Im medizinischen Bereich dagegen sind bakterielle Biofilme Infektionsquellen, weil der Biofilm dem Krankheitserreger einen geschützten Lebensraum bietet. Bakterien in einem Biofilm sind besser geschützt vor Antibiotika, Desinfektionsmitteln oder der Immunabwehr [Elvers *et al.* 2002, Luppens *et al.* 2002, Maira-Litran *et al.* 2000, Singh *et al.* 2002].

Die Fähigkeit der Bakterien zur Biofilmbildung kann durch Anwendung unterschiedlicher Methoden, wie z.B. Ausbreitung auf Agaroberflächen, Absorption von Farbstoffen (z.B. Kongorot (CR) und/oder Calcoflour (CF)), Anheftung an abiotische Grenzflächen, und die mikroskopische Analyse bakterieller Aggregate getestet werden [Römling *et al.* 1998a/2000, Bian *et al.* 2000, Spiers *et al.* 2002, Prouty und Gunn 2003].

I.1.1. Biofilmbildung bei Enterobakterien

Der Biofilm vieler Enterobakterien wird mit verschiedenen Infektionen in Verbindung gebracht. Beispiele hierfür sind die bakterielle Prostatitis Infektionen (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.* und *Enterococcus spp.*) [Domingue und Hellstrom 1998], Katheter-assoziierte Infektionen (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter faecalis*, *Proteus mirabilis* und *Morganella morganii*) [Elliott *et al.* 1997, Raad 1998, Stickler 1996, Donlan und Costerton 2002], Kontaktlinsen-assoziierte Infektionen (*E. coli*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*) [McLaughlin-Borlace *et al.* 1998, Zegans *et al.* 2002], gastrointestinale Infektionen (*Salmonella* Typhimurium, Enterotoxigenic, - Enteropathogenic und Enteroaggregative *E. coli* (ETEC, EPEC bzw. EAEC) [Bernet *et al.* 1994, Sheikh *et al.* 2001, Macfarlane *et al.* 2003] oder auch Gallenblasen Infektionen (*S. typhi* und *S. Typhimurium*) [Prouty *et al.* 2002].

Als Folge der Expression bestimmter extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS), die die extrazellulären Matrix bilden, zeigen die Enterobakterien auf CR-Agarplatten unterschiedliche Gestaltsformen und Farben (Morphotypen). Bei *S. Typhimurium* Stämmen sind einige der extrazellulären Matrixkomponenten, die zur Expression eines bestimmten Morphotypes führen, bekannt. Die Morphotypen dieser *S. Typhimurium*

Stämme können als Referenz benutzt werden um Hinweise über die Präsenz dieser Substanzen auch bei anderen Enterobakterien zu erhalten.

I.1.2. Vier charakteristischen Morphotypen von *S. Typhimurium*

Bei *S. Typhimurium* sind auf CR-Agarplatten die folgenden vier charakteristischen Morphotypen identifiziert worden: **rdar** (red, dry and rough), **pdar** (pink, dry and rough), **bdar** (brown, dry and rough), und **saw** (smooth and white) (s. Abb. 2.).

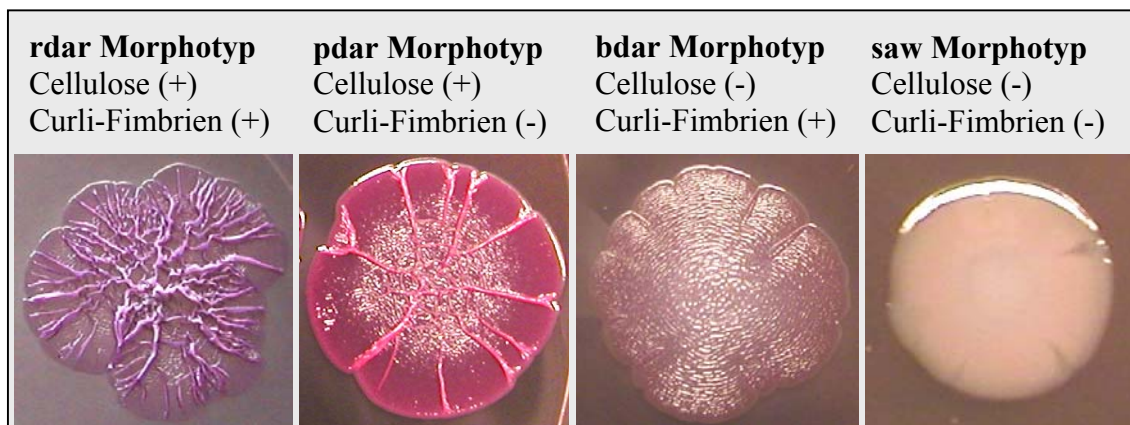


Abb. 2. Vier charakteristischen Morphotypen von *S. Typhimurium*.

Im rdar Morphotyp besteht die extrazelluläre Matrix aus zwei Hauptkomponenten Cellulose und Curli-Fimbrien. Aufgrund der Interaktion diese beiden Komponenten halten die Bakterienaggregate im rdar Morphotyp fest zusammen und lassen sich nur schwer resuspendieren.

Die Expression des rdar Morphotypes ist von den Umweltbedingungen abhängig. So ist die Expression des rdar Morphotypes wachstumsphasenabhängig (er wird in der stationären Phase, nicht aber in der logarithmischen Phase exprimiert) [Römling *et al.* 1998a, Gerstel und Römling 2001] und temperaturabhängig (er wird bei *S. Typhimurium* und *S. enteritidis* bei 28°C und nicht bei 37°C exprimiert). Die Expression des rdar Morphotypes unterbleibt ebenso bei hoher Osmolarität (0,5 M NaCl) oder bei Zugabe von Glukose (0,4 %) zum LB Medium [Römling *et al.* 1998a].

Auf genetischer Ebene wird die Expression des rdar Morphotypes von dem *csgD* Gen reguliert. Während die Curli-Fimbrien Biosynthese direkt von CsgD reguliert wird, erfolgt die Cellulose Produktion indirekt über CsgD. Für die Curli-Fimbrien codiert das *csgA* Gen, welches auf transkriptioneller Ebene von CsgD aktiviert wird. Die Cellulose Produktion wird von CsgD über das *adrA* Gen reguliert, welches für ein Regulatorprotein (AdrA) kodiert, das in Interaktion mit Bcs-Proteinen (bacterial cellulose synthesis) die Cellulose Biosynthese induziert.

Das multizelluläre Verhalten des rdar Morphotypes kann in unterschiedlichen Formen auftreten. Charakteristisch hierfür sind die Bildung von Bakterienaggregaten in Kultur, Pellikelbildung an der Luft-Flüssigkeit Grenze und Adhärenz an abiotischen Oberflächen (s. Abb. 3. A., B. und C.). Im Elektronenmikroskop zeigt der rdar Morphotyp eine honigwabenhähnliche Struktur. Hier werden die Bakterienzellen als Folge einer Co-Expression der Cellulose und Curli-Fimbrien von einer stark ausgeprägten extrazellulären Matrix umgeben (s. Abb. 3. D.).

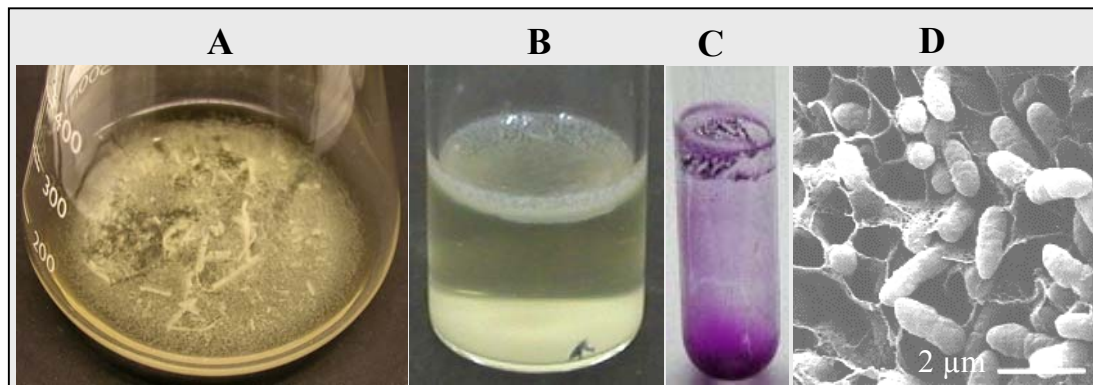


Abb. 3. Erscheinungsformen des rdar Morphotypes. **A.** Bakterienaggregate, **B.** Pellikel, **C.** Adhärenz, **D.** EM-Aufnahme,- Querschnitt aus der rdar-Bakterienaggregate (EM-Bild aus Römling and Rohde 1999).

Der rdar Morphotyp konnte ausser bei *S. Typhimurium* und *S. enteritidis* auch bei *E. coli* und *Citrobacter spp.* nachgewiesen werden [Römling *et al.* 1998b, Bian *et al.* 2000, Uhlich *et al.* 2001, Bokranz 2003, diese Arbeit].

Der pdar Morphotyp tritt auf CR-Agarplatten auf, wenn in *S. Typhimurium* die Curli-Fimbrien Biosynthese durch Mutationen ausgeschaltet ist [Römling *et al.* 1998b]. Somit exprimiert der pdar Morphotyp nur die eine der zwei rdar-Hauptkomponenten, nämlich Cellulose. Pdar-Bakterienaggregate haben eine gummiartige Konsistenz und lassen sich nur sehr schwer auflösen. Der Cellulose produzierende pdar Morphotyp konnte auch in *K. pneumoniae* und *E. sakazakii* nachgewiesen werden [diese Arbeit].

Der bdar Morphotyp erscheint auf CR-Agarplatten, wenn in *S. Typhimurium* eine Mutation die Cellulose Biosynthese unterbindet durchgeführt wurde [Römling *et al.* 2000, diese Arbeit]. Somit bildet der bdar Morphotyp ausschließlich Curli-Fimbrien als Hauptmatrixkomponente, jedoch keine Cellulose. Bakterienaggregate des bdar Morphotypes zeigen eine, verglichen zum rdar- oder pdar Morphotyp, fragile Konsistenz. Ausser bei *S. Typhimurium* konnte der bdar Morphotyp auch bei *Citrobacter spp.* gefunden werden [diese Arbeit].

Der saw Morphotyp exprimiert auf CR-Agarplatten keinen multizellulären Morphotyp. Mutationen in Cellulose und Curli-Fimbrien Biosynthese resultieren in einem Wechsel des Morphotyps von rdar- in saw [diese Arbeit].

I.2. Curli-Fimbrien

Curli-Fimbrien sind proteinöse flexible Filamente der extrazellulären Matrix. Sie sind 2-4 nm breit und bis zu 1 µm lang [Collinson *et al.* 1999]. Curli-Fimbrien sind sehr stabil. Sie können nur durch Behandlung mit Ameisensäure depolymerisiert werden [Collinson *et al.* 1991]. Curli-Fimbrien können eine Reihe von Humanproteinen binden wie z.B. Fibrinogen, Plasminogen, Laminin und Fibronectin [Olsen *et al.* 1989, Arnqvist *et al.* 1992, Sjöbring *et al.* 1994, Ben Nasr *et al.* 1996]. Chapman *et al.* (2002) fanden, dass Curli-Fimbrien amyloid-ähnliche Fimbrien sind. Amyloid wird in Verbindung mit schweren Krankheiten wie Alzheimer und Prion verursachenden Krankheiten gebracht. Bei *S. enteritidis* und *E. coli* konnte nachgewiesen werden, dass Curli-Fimbrien eine Invasion in Epithelzellen vermitteln [Dibb-Fuller *et al.* 1999, Gophna *et al.* 2001]. Zudem können Curli-Fimbrien auch an abiotische und biotische Oberflächen binden und ermöglichen so eine Biofilmbildung [Römling und Rohde 1999]. Curli-Fimbrien können auch an Cellulose binden. Die Co-Expression von Cellulose und Curli-Fimbrien führt zur Bildung einer inerten hydrophoben extrazellulären Matrix [diese Arbeit].

I.2.1. Die Curli-Fimbrien Operons in *S. Typhimurium*

Zwei divergent transkribierte Operons *csgDEFG* und *csgBAC* kodieren für die Curli-Fimbrien Biosynthese (s. Abb. 48.) [Hammer *et al.* 1995, Römling *et al.* 1998a]. CsgA ist die Untereinheit der Curli-Fimbrien, d.h. Curli-Fimbrien entstehen durch Polymerisation der CsgA Proteine. CsgB ist ein Nukleator Protein, welches die Verankerung der Curli-Fimbrien an die äussere Membran ermöglicht. CsgB wurde aber auch in die Curli-Fimbrien selbst nachgewiesen [Bian *et al.* 1989]. Die Funktion des CsgC ist noch nicht bekannt. Die Rolle der Proteine CsgE und CsgF an der Curli-Fimbrien Biosynthese ist nicht eindeutig geklärt. Für CsgE konnte gezeigt werden, dass es die Bindung der Curli-Fimbrien an die Fibronectin ermöglicht, jedoch nicht an der Polymerisation der Curli-Fimbrien Untereinheiten beteiligt ist [Chapman *et al.* 2002]. CsgF könnte als Nukleationsfunktion bei der Curli-Fimbrien Polymerisation funktionieren [Chapman *et al.* 2002]. CsgG ist ein äusseres Membran Protein, welches die Proteolyse der Proteine CsgA und CsgB verhindert [Loferer *et al.* 1997, Römling *et al.* 1998a]. CsgD ist der transkriptionelle Regulator für beide Curli-Fimbrien Operons,

welcher zur Superfamilie der LuxR-Proteine gehört [Hammar *et al.* 1995, Römling *et al.* 1998a/2000] Das Curli-Fimbrien Regulatorprotein CsgD wird wiederum von anderen Faktoren reguliert wie z.B. den Regulatorproteinen OmpR (outer membrane protein R), HNS (Histone-like nucleoid structuring protein) und RpoS (σ^S -Untereinheit der RNA-Polymerase) (Römling *et al.* 1998a/b] sowie von Umweltfaktoren wie z.B. Temperatur, pH und Osmolarität [Gerstel und Römling 2003].

I.3. Cellulose

Cellulose ist die am meisten verbreitete Substanz der Erde. Sie ist Hauptbestandteil der Pflanzen. So enthält Holz 40-50 % Cellulose, während Baumwolle fast ausschliesslich aus Cellulose besteht. Ausser Pflanzen, Cellulose produzieren auch Algen [Ek *et al.* 1998, Roberts *et al.* 2002], Cyanobakterien [Nobles *et al.* 2001], Dictyostellium [Grimson *et al.* 1996, Blanton *et al.* 2004], Urochordaten [Kimura und Itoh 1996, Matthysse *et al.* 2004] sowie viele Bakterienspezies [Kawagoe und Demler 1997, Ausmees *et al.* 1999, Solano *et al.* 2002, diese Arbeit]. Die Urochordaten sind unter dem Tierreich die einzigen Vertreter für Cellulose Biosynthese bekannt [Mathysse *et al.* 2004]. Die Urochordaten sind marine Chordaten (Invertebraten), die in drei Klassen unterteilt sind: Appendicularia, Talicaceae und Ascidia. Die Vertreter alle dieser drei Klassen können Cellulose produzieren [Nakshima *et al.* 2004].

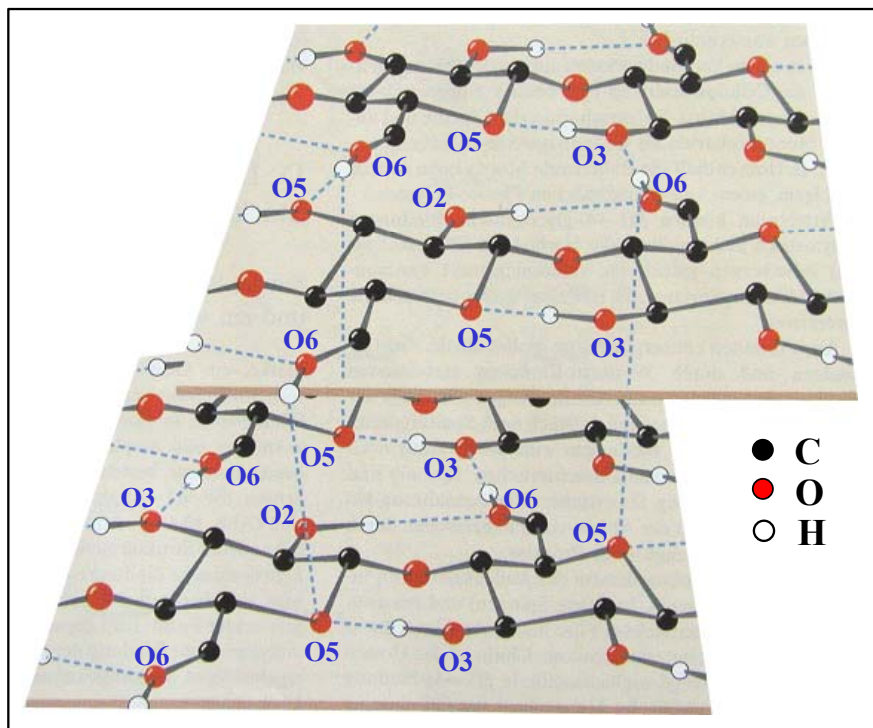


Abb. 4. Darstellung der chemischen Bindungen der Glukose Moleküle in der Cellulose. (aus dem Lehrbuch Biochemie [Voet, D. und Voet, J. G. 1994]). Modifiziert. C (Kohlenstoff), O (Sauerstoff), H (Wasserstoff). Weitere Erklärungen s. Text.

Cellulose ist ein lineares Polymer, welches aus β -1-4-glykosidische Bindungen der Glucoseeinheiten besteht. Eine Cellulosekette besteht aus bis zu 15000 verknüpften Glukose Molekülen. Abb. 4. zeigt die chemischen Bindungen der Glukose Moleküle miteinander. In der Cellulosekette ist ein Glukosemolekül um 180° zu seinem Nachbarmolekül gedreht und wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen O2 – O6 und O5 – O3 (”intra-molecular”-Bindungen) in dieser Position gehalten. Die Glukose Moleküle eines Cellulose Stranges werden über Wasserstoffbrückenbindungen mit Glukose Molekülen des benachbarten Cellulose Stranges in O3 – O6 (”Intra-Strand”-Bindungen) verbunden und bilden so eine Lage von Celluloseketten. Benachbarte Lagen sind jeweils um eine halbe Glukose-Einheit gegeneinander versetzt. Die Glukose Moleküle benachbarten Lagen werden über ”Intra-sheet” Bindungen von O5 – O6 verknüpft [Voet, D. und Voet, J. G. 1994, Jarvis, M. 2003].

Die schematische Bildung der Cellulose ist in der Abb. 5. dargestellt. Aus Celluloseketten, die durch ”Intra-Strand” und ”Intra-sheet” Bindungen entstehen, werden die Cellulose Mikrofibrillen gebildet (Durchmesser (\emptyset) 3-5 nm). Bis zu 20 Mikrofibrillen bilden dann die Makrofibrillen (\emptyset 10-30 nm), aus denen dann die Cellulose Fasern entstehen (\emptyset 0,5 μ m).

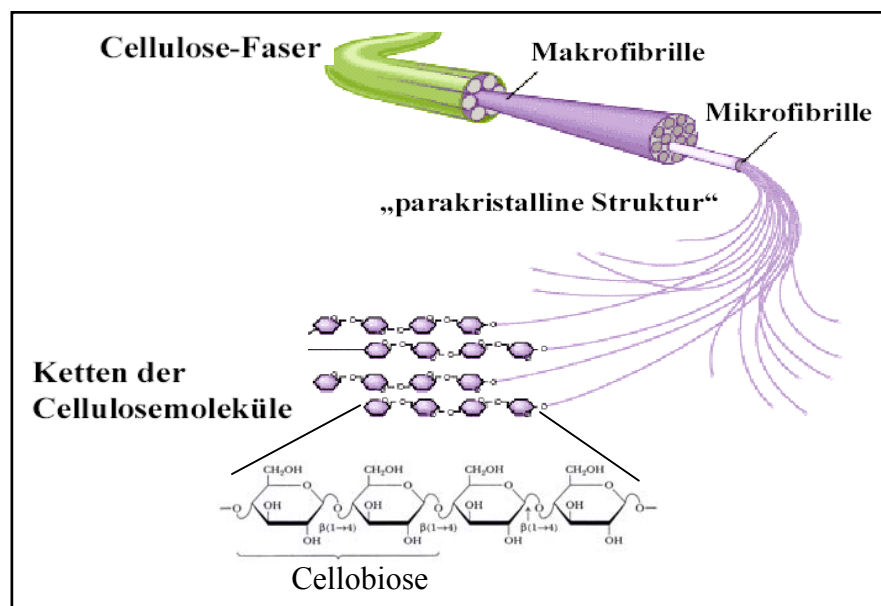


Abb. 5. Schematische Darstellung der Cellulose Bildung. (Schema entnommen aus www.genetik.uni-bielefeld.de). Modifiziert. Weitere Erklärungen s. Text.

Durch Röntgen-, NMR- (Nuclear magnetic resonance) Spectrometrie und Infrarot Analysen sind zwei Formen der kristallinen Cellulose nachgewiesen, Cellulose I und Cellulose II. Während in Cellulose I die Glukose Moleküle parallel angeordnet sind, liegen sie in Cellulose II antiparallel vor [Brown 2004]. Die kristalline Cellulose I hat

wiederum zwei Formen, die α - und die β -Form. Im Unterschied zur Cellulose α -Form, die als eine einsträngige, triklin Einheit vorliegt, besteht die Cellulose β -Form aus einer zweisträngigen monoklinen Einheit [Atalla und VanderHart 1984, Baker *et al.* 2000, Nishiyama *et al.* 2002/2003, Brown 2004].

I.3.1. Cellulose Biosynthese

Cellulose wird synthetisiert und kristallisiert von einem in der Cytoplasma Membran lokalisierten, multimeren Enzymkomplex, der als Terminal Komplex (TC) bezeichnet wird [Brown 1985, Delmer 1999]. Der Cellulose Biosynthese Enzymkomplex wurde erstmals von Brown und Montezinos (1976) in *Oocystis opiculata* beschrieben. Der TC ist in zwei Typen, in den linearen TC und den rosetten TC, klassifiziert. Den linearen TC der Cellulose Biosynthese besitzen einige Algen [Ek *et al.* 1998, Roberts *et al.* 2002], *Dictyostellium* [Grimson *et al.* 1996], Urochordaten [Kimura und Itoh 1996, Matthysse *et al.* 2004] und *G. xylinus* [Brown *et al.* 1976], während den rosetten TC der Cellulose Synthese Pflanzen besitzen [Mueller und Brown 1980, Verma und Hong 2001] und einige Algen aufweisen [Giddings *et al.* 1980].

In Abb. 6. sind EM-Aufnahmen der zwei TC-Typen der Cellulose Synthese dargestellt.

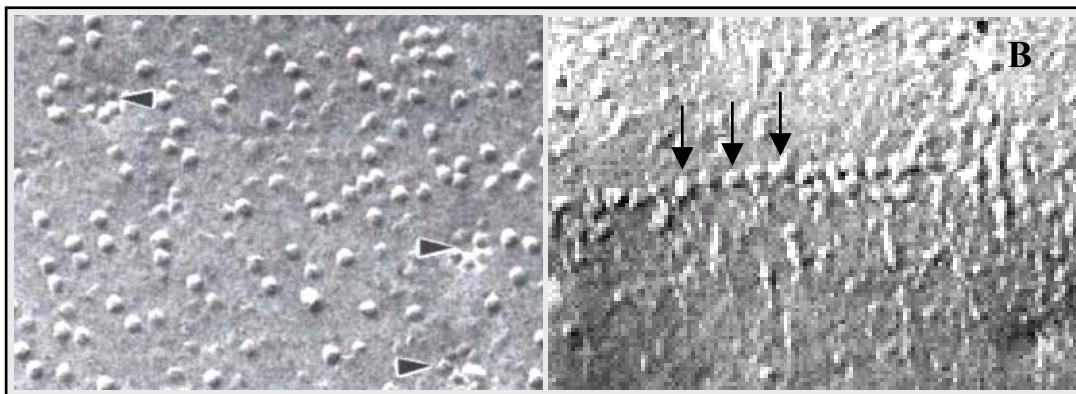


Abb. 6. Die zwei TC-Typen der Cellulose Biosynthese. **A.** Der rosette TC von *Zea mays* (Poaceae), Bild entnommen aus <http://cellwall.stanford.edu> und **B.** Der lineare TC von *G. xylinus*, Bild entnommen aus Kimura *et al.* 2001.

Die Cellulose Biosynthese wird von der Cellulose Synthase reguliert, welche das konservierte Motiv DDDQXXRW enthält. Eine Mutation in diesem Motiv führte zu Cellulose Biosynthese Störungen in Pflanzen [Saxena *et al.* 1994, Arioli *et al.* 1998]. Das erste Cellulose Synthase Gen bei *G. xylinus* wurde im Jahr 1990 und 6 Jahre später in Pflanzen identifiziert [Saxena *et al.* 1990, Pear *et al.* 1996].

Das Cellulose Synthase Protein nutzt UDP-Glukose als Substrat und synthetisiert diese zu Celluloseketten (s. Abb. 7 und 8). Ein anderes im Cellulose Operon lokalisiertes Gen

I.3.2. Cellulose Biosynthese bei Pflanzen

Die in der Cellulose Biosynthese am intensivsten untersuchte Pflanze *Arabidopsis thaliana* besitzt 10 *cesA* Gene (AtCesA1-AtCesA10). Warum die Pflanzen so viele Cellulose Synthase Gene besitzen ist nicht geklärt. Die AtCesA1, AtCesA3 und AtCesA6 induzieren die Cellulose Biosynthese der primären Zellwand, [Fogarad *et al.* 2000, Dospresz *et al.* 2002], während AtCesA4, AtCesA7 und AtCesA8 die Cellulose der sekundären Zellwand synthetisieren [Taylor *et al.* 1999/2003]. Cellulose Mikrofibrillen werden in einer strikt kontrollierten Orientierung synthetisiert, die das Senkrecht-Wachstum der Pflanzen ermöglichen. So zeigt die *rsw* (**r**adial **s**welling) Mutante von *A. thaliana* ein gestörtes Wachstum, da die Biosynthese der kristallinen Struktur der Cellulose reduziert ist [Arioli *et al.* 1998, Peng *et al.* 2000].

9

Wang *et al.* 2001]. Sowohl *ces*- als auch *csI*-Gene gehören der Cellulose Synthase Superfamilie an [<http://cellwall.stanford.edu>].

An der Cellulose Biosynthese der Pflanzen ist auch die Cellulose Karrigan (KOR) beteiligt. Das KOR Protein scheint für die Einlagerung der Cellulose in die Zellwand verantwortlich zu sein. Bei einer KOR-Mutante von *A. thaliana* war die Produktion der kristallinen Cellulose reduziert und die Pflanzen zeigten somit ein abnormales Wachstum [Nikol *et al.* 1988].

I.3.3. Cellulose Biosynthese bei *G. xylinus*

Gluconacetobacter xylinus ist das best untersuchte Cellulose bildende Bakterium. Eine *G. xylinus*-Zelle kann bis zu 200.000 Glukose Moleküle pro sec zu β -1,4-Glukan-Ketten verknüpfen. Die Cellulose wird bei *G. xylinus* aus den in der Cytoplasma Membran lokalisierten und linear angeordneten Poren des linearen TC synthetisiert. Jede dieser Poren ist ca. 3,5 nm Breit und enthält den Cellulose Synthase Komplex, welcher Glukose Moleküle zu Celluloseketten (bis zu 1,5 nm lang) synthetisiert. Durch Polymerisation von Celluloseketten entstehen dann die Cellulose Mikrofibrillen (s. Abb. 8.) [www.esf.edu, Kimura *et al.* 2001].

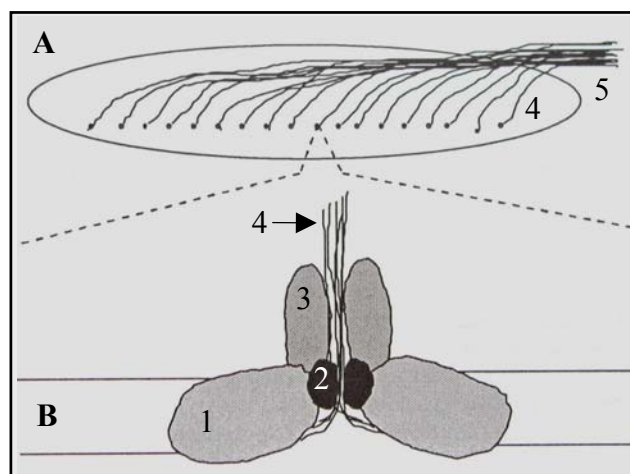


Abb. 8. Cellulose Synthase Komplex in *G. xylinus*. (Bild aus www.esf.edu/conferences/Cell_pdf/Saxena.pdf. Modifiziert A. Bakterienzelle mit linearem TC der Cellulose Synthase. B. Der Cellulose Synthase Komplex: 1. das Cellulose Synthase Protein; 2 und 3 zwei weitere im TC beteiligte Proteine, die vermutlich eine strukturelle Funktion haben; 4. Celluloseketten; 5. Cellulose Mikrofibrillen entstanden aus Polymerisation der Celluloseketten.

In Abb. 9. ist der Cellulose Biosynthese Weg schematisch dargestellt. Der erste Schritt der Cellulose Biosynthese ist die Umwandlung der Glukose zu Glukose-6-Phosphat (Glc-6-P) mit Hilfe des Enzyms Glukokinase (GK). Im zweiten Schritt wandelt das

Enzym Phosphoglukomutase (PG) die Glc-6-P zu Glukose-1-Phosphat (Glc-1-P) um, die dann von der UDPG-Pyrophosphorylase (UDPG-P) zu UDP-Glukose prozessiert wird. Anschließend nutzt die Cellulose Synthase (CS) die UDP-Glukose als Substrat für die Cellulose Biosynthese [Ros *et al.* 1991].

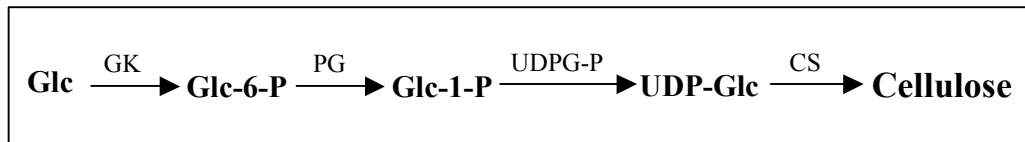


Abb. 9. Der Cellulose Biosynthese Weg bei *G. xylinus*. Abkürzungen und weitere Erklärungen s. Text.

I.3.4. Bakterielle Cellulose

Zahlreiche Bakterienspezies produzieren Cellulose. Die am besten untersuchten Cellulose produzierenden Bakterien sind *Gluconacetobacter xylinus*, *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* [Kawagoe und Demler 1997, Ausmees *et al.* 1999, Brown 2004]. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass auch einige Spezies der Familie Enterobacteriaceae Cellulose als Komponente der Extrazellulären Matrix bilden können [Solano *et al.* 2002, diese Arbeit].

Die Rolle der Cellulose bei Bakterien ist unterschiedlich, sie ermöglicht z.B. *Rhizobium* spp. die Adhärenz an die Wurzeln der Wirtspflanze [Smit *et al.* 1992], dem Bakterium *G. xylinus* verleiht Cellulose Schutz vor UV Strahlung [Brown 2004], während bei *S. enteritidis* die Resistenz gegen Chlorine gesteigert wird [Solano *et al.* 2002].

Welche konkrete Rolle die Cellulosebildung bei Enterobakterien im klinischen Bereich spielt, ist noch nicht eindeutig nachgewiesen. Zwischen Cellulose produzierenden und Cellulose Mutanten der *S. enteritidis* Stämme konnte kein Unterschied bei der Invasion von HEP-2 Zellen festgestellt werden [Solano *et al.* 2002]. Aus den bisher erhaltenen Informationen lässt sich schlußfolgern, dass die Cellulose keinen Effekt an der Virulenz von Enterobakterien hat [Solano *et al.* 2002]. Es wird vermutet, dass die Cellulose bei Enterobakterien besonders außerhalb des Wirtes eine große Rolle spielt, wie z.B. bei der Biofilmbildung oder Zell-Zell Interaktionen [Römling 2002]. Diese Annahme unterstützend, wurde kürzlich nachgewiesen, dass Cellulose bei *S. Typhimurium* keine Rolle bei der Biofilmbildung in Gallensteinen spielt [Prouty und Gunn 2003].

Wegen dem hohen Reinheitsgrad, dem hydrophilen Charakter, der hohen Absorbtiionsfähigkeit sowie der mechanischen Festigkeit findet die bakterielle Cellulose (BC) vermehrt Anwendung in vielen Bereichen der Industrie und Medizin. In der Lebensmittelindustrie wird BC als Bindemittel, Dickungsmittel oder als Nata (Nata de

coco, Dessertart in Asien) benutzt, in der Elektronik (Sony) werden Lautsprecher-membranen aus BC hergestellt, denn sie können den natürlichen Klang besser reproduzieren, in der Papier- und Textilindustrie wird BC als Zusatzstoff benutzt. Besonders in der Medizin spielt die BC eine wichtige Rolle als Wundverband oder als Implantat, denn sie ist ein sehr gut verträgliches Biomaterial. Zur Herstellung und Anwendung von Wundverband aus BC sind vorallem zwei Große Institute bekannt, das Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie in Bad-Langensalza [www.fzmb.de] und das Institut Fibrocel in Brasilien [www.biofill.com.br]. Als Implantatmaterial ist die BC unter den Namen BASYC bekannt (Bacterial Synthesized Cellulose), welches an der Universität Jena entwickelt wurde.

I.3.5. Die Cellulose Operons in *S. Typhimurium*

S. Typhimurium besitzt zwei divergent transkribierte Operons *bcsABZC* und *bcsEFG*, die an der Cellulose Biosynthese beteiligt sind (s. Abb. 25.). Zwischen den beiden Operons liegen in einer Transkriptionseinheit die Gene *yhjR* und *yhjQ*. Die Funktion des *yhjR* Genes ist noch nicht bekannt. Das Gen *yhjQ* ist in der Zellteilung und der Zellmorphologie der *E. coli*-Bakterien beteiligt [Kim *et al.* 2002].

BcsA ist das Cellulose Synthase Protein, welches in der Cytoplasma Membran lokalisiert ist [Kimura *et al.* 2001, Römling 2002]. BcsA bindet Uridine-5-diphosphoglucose (UDP-Glukose), welches als Substrat für die Cellulose Biosynthese dient [Lin *et al.* 1990]. Das Protein BcsB ist ebenfalls in der Cytoplasma Membran lokalisiert und bindet cyclic-diguanylic-GMP (c-di-GMP). Das c-di-GMP ist als Aktivator der Cellulose Biosynthese in *G. xylinus* identifiziert worden [Ross *et al.* 1998]. Das BcsZ Protein ist eine endo-1,4- β -Glucanase [Park und Yun 1999, diese Arbeit] und ist ebenfalls an der Cellulose Biosynthese beteiligt [Matthysse *et al.* 1995a/b, diese Arbeit]. Das Gen *bcsC* kodiert für eine putative Oxidoreduktase und ist wahrscheinlich an der Bildung eines membrangebundenen Protein-Komplex beteiligt, der das Extrudieren der Cellulose ermöglicht [Wong *et al.* 1990, Römling 2002].

Die Funktion des *bcsEFG* Operons in der Cellulose Biosynthese ist noch nicht eindeutig geklärt. Während das Protein BcsG als Endoglucanase identifiziert wurde, sind die Funktionen der Proteine BcsE und BcsF noch nicht bekannt [Solano *et al.* 2002].

CsgD, als Regulator des gesamten rdar Morphotypes, reguliert gleichzeitig auch die Cellulose Biosynthese. Die Regulation der Cellulose Biosynthese durch CsgD erfolgt jedoch nicht direkt, da die Transkription der Cellulose Gene *bcsA* und *bcsC* nicht von CsgD abhängig sind [diese Arbeit]. CsgD reguliert somit die Cellulose Biosynthese

indirekt über das *adrA* Gen, welches auf transkriptioneller Ebene von CsgD aktiviert wird [Bokranz 2003]. AdrA selbst interagiert vermutlich mit den Bcs-Proteinen und aktiviert so die Cellulose Biosynthese.

I.4. Ziel der Arbeit

S. Typhimurium bildet auf CR-Agarplatten den charakteristischen rdar Morphotyp aus, der aus einer sich ausbreitenden Kolonie mit matter Oberfläche besteht, die den Farbstoff Kongorot in charakteristischer Weise absorbiert, so dass eine rötliche Kolonie auf Agarplatten zu sehen ist. Diese Koloniemorphologie wird hier als rdar Morphotyp bezeichnet. Absorption von Kongorot wird durch die Expression von extrazellulären Matrixkomponenten vermittelt. Als eine Komponente der extrazellulären Matrix konnten zuvor schon Curli-Fimbrien identifiziert werden [Olsen *et al.* 1989, Römling *et al.* 1998a]. Es wurde jedoch beobachtet, dass Bakterien, die in der Lage sind einen Biofilm zu bilden und dabei den charakteristischen rdar Morphotyp exprimieren, nach knock-out von Curli-Fimbrien auf CR-Agarplatten pink erscheinen (pdar Morphotyp). Dies war ein erster Hinweis darauf, dass neben Curli-Fimbrien noch eine weitere Komponente an der Biofilmmatrix beteiligt sein muss. Elektronenmikroskopische Studien bestätigten diese Vermutung.

In meiner Diplomarbeit hatte ich bereits spezifisch nach Genen gesucht, die für die Produktion dieser unbekannten extrazellulären Matrixkomponente verantwortlich sind. Dabei hatte ich jeweils vier Transposonmutanten in zwei benachbarten Genen mit unbekannten Funktionen *yhjO* und *yhjL* identifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass *YhjO* und *yhjL* eine hohe Homologie zu Genen des Cellulose Biosynthese Operons von *G. xylinus*, einem Modellorganismus für Cellulose Biosynthese, aufwiesen.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Funktionen der Gene *yhjO* und *yhjL* näher charakterisiert werden. Neben *yhjO* und *yhjL* sollten zudem die Gene *yhjN* und *yhjM* untersucht werden, da diese vermutlich zusammen in einem Operon liegen. Diese Untersuchungen sollten mit Hilfe bioinformatischer sowie biochemischer und chemischer Methoden genauer untersucht werden. *YhjO* wies hohe Homologie zu dem *bcsA* Gen auf, welches für die katalytische Untereinheit der Cellulose Synthase von *G. xylinus* kodiert. Da die erhaltenen Transposonmutanten polar waren, sollte eine In-frame Deletionsmutante in *yhjO* konstruiert werden, um eine direkte Beteiligung von *yhjO* an der Biosynthese der unbekannten Substanz nachweisen zu können.

Die Identität der unbekannten Substanz sollte über phenotypische, genetische, biochemische und chemische Methoden nachgewiesen werden. Aufgrund der genannten

Homologie zwischen den Genen *yhjO*, *yhjN*, *yhjM*, *yhjL* und den Cellulose Biosynthese Genen von *G. xylinus*, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei der unbekannten Substanz der extrazellulären Matrix um Cellulose oder einem verwandten β -Glukan handeln könnte.

Weiterhin sollte der Effekt der unbekannten extrazellulären Substanz auf die Biofilmbildung sowie andere Eigenschaften der Bakterien untersucht werden. Darüberhinaus sollte die Interaktion zwischen Cellulose und Curli-Fimbrien genauer charakterisiert werden. Weiter sollte getestet werden, ob *yhjO* sowie die Gene des Curli-Fimbrien Operons auch in anderen Gattungen der Enterobacteriaceae vorkommen. Bei Nachweis der genannten Gene sollte zudem getestet werden, ob diese auch exprimiert werden. Hierzu sollte eine Anreicherungsverfahren für die Curli-Fimbrien entwickelt werden.

II. Material und Methoden

II.1. Geräte

Autoklav:	HST 4-5-6; Zirbus; Sauter
Northern Blot-Apparatur:	Biorad
Western Blot-Kammer:	Biorad
Brutschränke:	Heraeus
Digitalkamera:	Camedia C-3030 Zoom; Olympus
DNA-Elektrophoresekammern:	Horizon 58, Life Technologies; Wide Mini Sub TM Cell und Mini Sub Cell, Biorad; HE99X-15-1.5, Pharmacia Biotech
Elektroporator:	Gene Pulser + Pulse Controller Plus, Biorad
ELISA-Reader:	Spectramax 250, MWG Biotech AG
Entwicklermaschine:	Urx 60, Agfa
GC-MS:	Gaschromatograph-Massenspektroskopie. GCQ Ion Trap Mass Spectrometer; Finnigan; ausgerüstet mit einer 30 m DB5 Kapillarsäule (Innendurchmesser: 0,25 mm; Trägergas Helium)
Gefrierschränke (-70°C):	VIP Series, Sanyo
Geltrockner:	Biotec Fischer
Heizblöcke:	Anachem 1202, Anachem House Thermostat 5320, Eppendorf Thermomixer 5436, Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf
Hybridisierungsöfen:	Micro 4, Hybaid
Kamera für Gele:	E.A.S.Y., Herolab
Kamera für Platten:	Reprostar II; Camag + WV-BM 900, Panasonic
Lyophylle:	Alpha 1-2, Christ
MALDI-TOF-MS:	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight-Mass Spectroscopy. Reflex TM MALDI-TOF, Bruker-Franzen
PCR-Geräte:	Polymerase chain reaction. Varius V, Landgraf; T3 Thermocycler, Biometra
Photometer:	Spectro 4053 Kinetics, LKB Biochrom; Spectro U-2000, Hitachi; Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech; Biophotometer, Eppendorf;
Rundlaufinkubator:	TC-7-WB120; New Brunswick Scientific Co. Inc
Schüttelinkubatoren:	HT Infors Multitron; Infors
Schüttler:	GFL 3016; BLB WT 12; Biometra
SDS-PAGE-Kammern:	Minigel Twin, und Minigel G 41; Biometra

Sequenziergelkammer:	Roth
Sterilarbeitsbank:	Sterilguard III; Advance
Transformatoren:	Standard Power Pack P 25, Biometra EPS 600, EPS 3501 und LKB-GPS 200/400, Pharmacia Biotech; Power Pack 300, Biorad;
Ultraschallgerät:	Sonifier 250, Branson
Ultrazentrifugen:	Optima TLX, Beckmann LS-50 M/E, Beckmann
UV-Tisch:	Intas 302, Polaroid
Vakuumtrockner:	SpeedVac Concentrator, Bachofer Concentrator 5301, Eppendorf
Zentrifugen:	Zentrifuge Nr: 5402, 5403 und 5415 C, Eppendorf; Biofuge A, Biofuge 13, Megafuge 3.0R, Heraeus; Zentrifuge Nr: J2-HS, J2-21, J-25; Beckmann;

II.2. Kooperationspartner

- 1). **Dr. Manfred Nimtz**, GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung – Braunschweig); Art der Kooperation: Messung der zuckerhaltigen- und/oder proteinhaltigen- Proben im GC-MS bzw. MALDI-TOF und Q-TOF.
- 2). **Dr. Heinrich Lünsdorf** und **Dr. Manfred Rohde**, GBF; Art der Kooperation: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierter Cellulose oder von ganzen Bakterienaggregate.

II.3. Computerprogramme und Internetadressen

MS Office 1997 und 2000; Paint Shop Pro 6.0; Adobe Photoshop 5.0; Genetics Computer Group (GCG); Olympus Camedia Master 2.0; Chromas 1.45; DNASTar 4.00; ClustalX; GeneDoc; Treev32.

www.ncbi.nlm.nih.gov/ :	NCBI; National Center for Biotechnological Information
www.ebi.ac.uk/fasta33/ :	EMBL-EBI; European Bioinformatics Institute
www.expasy.ch/tools/ :	Expasy - Swiss Institute of Bioinformatics
www.sanger.ac.uk/ :	Sanger Center UK
www.atcc.org/ :	American Type Culture Collection
www.dsmz.de/ :	Deutsche Sammlung von Mikroorg. und Zellkulturen
www.gatc.de/ :	GATC Biotech AG
http://ngfnblast.gbf.de/ :	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
www.embl-heidelberg.de/ :	European Molecular Biology Laboratory
http://genome.wustl.edu/ :	Genome Sequencing Center – Washington
www.cifn.unam.mx/ :	Centro de Investigation Sobre Fijacion de Nitrogeno
http://bioweb.pasteur.fr/ :	Pasteur – Institut
www.erc.montana.edu/ :	The Center for Biofilm Engineering
www.botany.utexas.edu/ :	The Cellulose Electronic Network
www.wiley.com/ :	Current Protocols

II.4. Chemikalien

Während dieser Arbeit benutzte Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia, Bio, Biolabs, Biorad, Boehringer Mannheim, Carl Roth GmbH & Co, Difco, Eurogentec, Fluka, Hoechst, Life Technologies, Machery-Nagel, Merck, Millipore, MoBiTec, Novex, Oxoid, PeqLab, Promega, Qiagen, Serva und Sigma. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit Wasser angesetzt. Wasser wurde ausschließlich in deionisierter Form (zweifach destilliert) verwendet. Sterilisation erfolgte in der Regel mittels Autoklavieren. Hierfür wurden die Lösungen und Festbestandteile für 30 min auf 121°C erhitzt. In den Fällen, in denen Lösungen sterilfiltriert wurden, fanden Filter der Firma Pall Gelman Laboratory mit einer Porengröße von 0,2 oder 0,4 µm Verwendung.

II.5. Rezepte für Flüssigmedien und Agarplatten

II.5.1. Rezepte für Flüssigmedien

Luria-Bertani-Medium (LB):	Bacto-Trypton	10	g
	Bacto-Hefeextrakt	5	g
	NaCl	7	g
	H ₂ O	ad 1	l
	Sterilisation durch Autoklavieren		
LB-Medium ohne Salz:	Bacto-Trypton	10	g
	Bacto-Hefeextrakt	5	g
	H ₂ O	ad 1	l
	Sterilisation durch Autoklavieren		
SOB-Medium:	Bacto-Trypton	20	g
	Bacto-Hefeextrakt	5	g
	NaCl	0,6	g
	KCl	0,19	g
	H ₂ O	ad 1	l
	Sterilisation durch Autoklavieren		
SOC-Medium:	SOB-Medium		
	MgCl ₂	10	mM
	MgSO ₄	10	mM
	Glukose	20	mM

Die Glukoselösung wurde sterilfiltriert, die Salzlösungen autoklaviert.

5 x M9-Minimal-Basis	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	37,6	g
	KH ₂ PO ₄	5	g
	NH ₄ Cl	5	g
	NaCl	2,5	g
	H ₂ O	ad 1	l
	Sterilisation durch Autoklavieren		

II.5.2. Rezepte für Agarplatten

LB-Agar:	Bacto-Trypton	10	g
	Bacto-Hefeextrakt	5	g
	NaCl	7	g
	Bacto-Agar	15	g
	H ₂ O	ad 1	l
	Sterilisation durch Autoklavieren		

LB-Agar ohne Salz:	Bacto-Trypton	10	g
	Bacto-Hefeextrakt	5	g
	Bacto-Agar	15	g
	H ₂ O	ad 1	l
	Sterilisation durch Autoklavieren		
T-Medium-Agar:	Bacto-Trypton	10	g
	Bacto-Agar	15	g
	H ₂ O	ad 1	l
	Sterilisation durch Autoklavieren		
Kongorot (CR)- Agarplatten:	LB-Agar ohne Salz	500	ml
	Kongorot-Lösung	10	ml
Calcofluor-Agarplatten:	LB-Agar ohne Salz	500	ml
	50 mM Calcofluor	0,5	ml
Die Farbstofflösung wurde vorher sterilfiltriert, der Agar autoklaviert.			
Kornberg-Agarplatten:	K ₂ HPO ₄	1,1	%
	KH ₂ PO ₄	0,85	%
	Bacto-Hefeextrakt	0,6	%
	Glukose	1	%
	Bacto-Agar	15	g
M9-Agarplatten:	Bacto-Agar	7,5	g
	H ₂ O	400	ml
	Sterilisation durch Autoklavieren		
	5 x M9-Minimal-Basismedium:	100	ml
	1 M MgSO ₄ -Lösung	0,5	ml
	1 M Glukose-Lösung	10	ml
	Thiamin-Lösung (10 mg/ml)	25	µl
	1 M CaCl ₂ -Lösung	135	µl
	Die Glukoselösung wurde sterilfiltriert, die Salzlösungen autoklaviert.		
2,2-Dipyridyl- Agarplatten:	LB-Agar ohne Salz	500	ml
	2,2-Dipyridyl- Lösung	2	µM
Die Chelatorlösung wurde zuvor sterilfiltriert.			
X-Gal-Agarplatten:	LB-Agar ohne Salz		
	X-Gal	40 mg/l	
X-Gal wurde in N,N-Dimethylformamid gelöst.			
EBU-Agarplatten:	Bacto-Trypton	5	g
	Bacto-Hefeextrakt	2,5	g
	NaCl	2,5	g
	Glukose	1,25	g
	Bacto-Agar	7,5	g
	H ₂ O	480	ml
	Sterilisation durch Autoklavieren		
anschließend Zugabe von:	1 % Evans-Blue-Lösung	0,625	ml
	1 % Fluorescein-Lösung	1,25	ml
	12,5 % K ₂ HPO ₄ -Lösung	20	ml
Die Farbstofflösungen wurden sterilfiltriert, die Salzlösung autoklaviert.			
TOP-Agar:	Bacto-Agar	7	g
	LB-Medium	ad 1	l
	Sterilisation durch Autoklavieren		

II.6. Standardpuffer und Lösungen

Essig-Salpetersäure-Lösung:	80%ige Essigsäure	150	ml
	konz. Salpetersäure	15	ml

Kongorot-Lösung:	Kongorot (CR)	2	mg/ml
	Brilliant-Blue-G	1	mg/ml
	beides zusammen gelöst in 70 % Ethanol		

Lugolsche- Lösung:	I ₂	0,01	M
	KI	0,03	M

TE-Puffer, pH 8:	Tris-Base	10	mM
	EDTA	1	mM

Der pH wurde mit HCl auf 8 eingestellt. Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren.

ES- Puffer, pH 9,5:	EDTA	0,5	M
	N-Lauroylsarcosine	1	%

Rousconi-Mix:	Lysozym	0,5	mg/ml
	EDTA	25	mM
	Tris-Base	25	mM
	RNase A	0,1	mg/ml

in wässriger 10 % Glycerollösung + ein paar Kristalle Phenolblau; Lagerung bei –20°C

TB-Puffer (pH 6,7):	PIPES	10	mM
	CaCl ₂	15	mM
	KCl	250	mM

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 6,7 eingestellt. Anschließend wurden 55 mM MnCl₂ hinzugefügt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4° C aufbewahrt.

β-Galaktosidase-Enzympuffer (pH 7):	Na ₂ HPO ₄	61	mM
	NaH ₂ PO ₄	39	mM
	KCl	10	mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10	mM
	H ₂ O	1	l

Sterilisation durch Filtration

Arbeitspuffer (nicht älter als 7 Tage): 1 M DTT 40 µl
zu 100 ml Enzympuffer; Lagerung bei 4° C

o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (ONPG; nicht älter als 7 Tage):

ONPG 0,1 g

in 25 ml Enzympuffer aufnehmen; vor Licht schützen; Aufbewahrung bei –20° C.

10 x PBS:	KCl	19,76	g
	NaCl	80,06	g
	KH ₂ PO ₄	2,04	g
	Na ₂ HPO ₄	28,65	g
	H ₂ O	ad 1	l

Sterilisation durch Autoklavieren

2 x Auftragspuffer (90 ml):	0,5 M Tris-Base pH 6,8	25	ml
	87 % Glycerol	20	ml
	SDS	4	g
	Bromphenolblau	0,2	g
	H ₂ O	45	ml

1 x Auftragspuffer (1 ml):	2 x Auftragspuffer	475	µl
	H ₂ O	475	µl

	β -Mercaptoethanol	50	μ l
10 x SDS-Laufpuffer:	Tris-Base	30	g
	Glycin	144	g
	SDS	10	g
	H ₂ O	1	l
Coomassie-Färbelösung:	Coomassie-Blue R-250	0,25	%
	Methanol	40	%
	Essigsäure	10	%
	Wasser	500	ml
Colloidal-Färbelösung nach Neuhoff (Neuhoff et al., 1988):			
Lösung A:	85 % H ₃ PO ₄	20	g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	100	g
	H ₂ O	1	l
Lösung B:	Coomassie-Blue G-250	5	%
	Wasser	10	ml
Lösung C:	Lösung A	98	ml
	Lösung B	2	ml
Für ca. 2 h bei RT schütteln; vor Gebrauch: 80 ml Lösung C + 20 ml Methanol			
Coomassie-Entfärber:	Methanol	40	%
	Essigsäure	10	%
	Wasser	500	ml
10 x Blotpuffer:	Tris-Base	60	g
	Glycin	29	g
	SDS	3,7	g
	H ₂ O	1	l
1 x Blotpuffer:	10 x Blotpuffer	100	ml
	Methanol	200	ml
	H ₂ O	700	ml
10 x TBS, pH 7,6:	Tris-Base	24,22	g
	NaCl	80	g
	H ₂ O	800	ml
Tween-TBS (TBST):	1 x TBS	999	ml
	Tween-20	1	ml
10 x TBE, pH 8,3:	Tris-Base	45	mM
	Borsäure	45	mM
	EDTA	1	mM
	H ₂ O	1	l
	Sterilisation durch Autoklavieren		
50 x TAE, pH 7,5:	Tris-Base	2	M
	Natriumacetat	1	M
	EDTA	0,05	M
	H ₂ O	50	ml
	Sterilisation durch Autoklavieren		
5 x DNA-Auftragspuffer:	30 % (w/v) Ficoll	20	ml
	500 mM EDTA, pH 8,0	4	ml
	20 % (w/v) SDS	1	ml
	50 x TAE, pH 7,5	0,8	ml

	0,5 % (w/v) Xylenblau	2	ml
	0,5 % Bromphenolblau	2	ml
	H ₂ O	40	ml
NaOH-Lösung:	NaOH	0,2	M
	SDS	1	%
	Jedesmal frisch angesetzt		
Kaliumacetatlösung:	5 M Kaliumacetat	60	ml
	Essigsäure (konz.)	11,5	ml
	H ₂ O	28,5	ml
GET-Lösung:	Glukose	50	mM
	Tris-Base, pH 8	25	mM
	EDTA	10	mM
	Sterilisation durch Autoklavieren		

II.7. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Die während dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in die Tab.

1. A. und 1. B. bzw. in die Tab. 2. aufgelistet.

Tab. 1. A. Liste der verwendeten Bakterienstämme.

Spezies	Stamm	Genotyp	Phänotyp 28°C / 37°C	Referenz
<i>S. Typhimurium</i>	UMR1	ATCC 14028-1s; Nal ^r	rdar / saw	Römling <i>et al.</i> 1998a
<i>S. Typhimurium</i>	MAE28	UMR 1 Δ agfD::Km ^r	saw / saw	Römling <i>et al.</i> 2000
<i>S. Typhimurium</i>	MAE42	SF 1005 x MAE52; MAE52 <i>rpoS</i> ::pRR10 (Δ trfA); Amp ^r	bdar / bdar	Römling <i>et al.</i> 1998b
<i>S. Typhimurium</i>	MAE49	UMR 1 <i>PagfD2</i> Δ ompR::Amp ^r	saw / saw	Römling <i>et al.</i> 2000
<i>S. Typhimurium</i>	MAE51	UMR1 <i>PagfD2</i> Δ agfD	saw / saw	Römling <i>et al.</i> 2000
<i>S. Typhimurium</i>	MAE52	UMR 1 <i>PagfD1</i>	rdar / rdar	Römling <i>et al.</i> 1998b
<i>S. Typhimurium</i>	MAE97	MAE 52 Δ agfBA	pdar / pdar	Römling <i>et al.</i> 2000
<i>S. Typhimurium</i>	MAE103	MAE 52 <i>agfBA</i> <i>adrA</i> ::MudJ; Km ^r	saw / saw	Römling <i>et al.</i> 2000
<i>S. Typhimurium</i>	MAE150	MAE52 <i>bcsA</i> ::MudJ; Km ^r	bdar / bdar	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE155	MAE52 <i>bcsC</i> ::MudJ; Km ^r	bdar / bdar	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE160	MAE42 <i>bcsC</i> ::MudJ <i>rpoS</i> ::pRR10(Δ trfA); Amp ^r , Km ^r	bdar / bdar	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE161	MAE51 <i>bcsC</i> ::MudJ Δ agfD; Nal ^r , Km ^r	saw / saw	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE164	MAE42 <i>bcsA</i> ::MudJ <i>rpoS</i> ::pRR10(Δ trfA); Amp ^r , Km ^r	bdar / bdar	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE165	MAE51 <i>bcsA</i> ::MudJ Δ agfD; Nal ^r , Km ^r	saw / saw	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE171	MAE52 Δ bcsA; Nal ^r	bdar / bdar	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE174	MAE52 Δ bcsA <i>adrA</i> ::MudJ;	bdar / bdar	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE190	MAE52 <i>bcsA</i> ::MudJ Δ agfBA; Nal ^r , Km ^r	saw / saw	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE192	MAE52 <i>bcsC</i> ::MudJ Δ agfBA; Nal ^r , Km ^r	saw / saw	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE196	MAE52 <i>glgAC</i> ::MudJ; Nal ^r , Km ^r	rdar / rdar	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE198	MAE97 <i>glgAC</i> ::MudJ; Nal ^r , Km ^r	pdar / pdar	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE218	MAE51 <i>glgAC</i> ::MudJ; Nal ^r , Km ^r	saw / saw	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE220	MAE52 Δ dppF; Nal ^r	rdar / rdar	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE222A	UMR1 <i>bcsA</i> ::MudJ; Nal ^r Km ^r	bdar / saw	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	MAE224A	UMR1 Δ bcsZ; Nal ^r Cm ^r	bdar / saw	Diese Arbeit

<i>S. Typhimurium</i>	MAE225A	MAE52 $\Delta bcsZ$; $\text{Nal}^r \text{ Cm}^r$	bdar / bdar	Diese Arbeit
<i>S. Typhimurium</i>	ADR1a	MAE52 <i>adrA</i> :: MudJ ; Km^r	bdar / bdar	Römling <i>et al.</i> 2000
<i>S. Typhimurium</i>	ADR1b	MAE51 <i>adrA</i> :: MudJ ; Km^r	saw / saw	Römling <i>et al.</i> 2000
<i>E. coli</i>	Tob1	Wildtyp (Wt)	rdar / rdar	Römling
<i>E. coli</i>	Tob2	$\Delta csgD$; Cm^r	saw / saw	Diese Arbeit
<i>E. coli</i>	Tob3	$\Delta bcsA$; Cm^r	bdar / bdar	Diese Arbeit
<i>K. pneumoniae</i>	DSM12082	Wt	pdar / pdar	Laborsammlung
<i>E. coli</i>	MC4100	K-12 F ⁻ <i>araD139</i> $\Delta(\text{argF-lac})_{\text{U169}}$ <i>rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1</i> <i>ptsF25 rbsR</i>	bas / saw	Laborsammlung
<i>E. coli</i>	Nissle 1917	Wt	pdar / pas	Römling
<i>Pseudomonas putida</i>	KT2440	Wt	saw / saw	Timmis
<i>Citrobacter spec.</i>	Fec2	Wt	rdar / pdar	Römling
<i>C. freundii</i>	Fec4	Wt	rdar / rdar	Römling
<i>C. kos./farmeri</i>	Fec157	Wt	saw / saw	Bokranz 2003
<i>E. spec.</i>	Fec125	Wt	pdar / pas	Bokranz 2003
<i>E. aerogenes</i>	Fec135	Wt	pdar / pdar	Bokranz 2003
<i>E. cloacae</i>	Fec36	Wt	saw / pas	Bokranz 2003
<i>E. sakazakii</i>	Fec39	Wt	pdar / pdar	Bokranz 2003
<i>Klebsiella spec.</i>	Fec164	Wt	saw / saw	Bokranz 2003
<i>K. oxytoca</i>	Fec139	Wt	saw / saw	Bokranz 2003
<i>K. pneumonia</i>	Fec141	Wt	saw / saw	Bokranz 2003
<i>R. ornithinolytica</i>	Fec153	Wt	saw / saw	Bokranz 2003
<i>P. mirabilis</i>	Fec162	Wt	saw / saw	Bokranz 2003

Tab. 1. B. Liste der verwendeten Hilfsstämme.

Spezies	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>S. Typhimurium</i>	SR-11	Wt; resistent gegen den Phagen P22	Laborsammlung
<i>S. Typhimurium</i>	LB5010 (SH9312)	<i>metA22, metE551, ilv-452, leu-3121, trpC2, xyl-404, galE856, hsdL6, hsdSA29, hsdSB121, rpsL120, H1-b, H2-e,n,x fla-66 nml(±) Fel-2(±)</i>	Bullas und Ryu, 1983
<i>S. Typhimurium</i>	DA1705	<i>HisD9953::MudJ his-9949::MudI</i>	D. Andersson
<i>E. coli</i>	DH5 α	K-12 <i>EndA1 hsdR17 SupE44 thi-1 recA1 gyrA1 relA1</i> $\Delta(\text{lacZYA-argF})_{\text{U169}}$ (m80lacZ Δ M15)	Laborsammlung

Tab. 2. Liste der verwendeten Plasmide.

Plasmide	Charakterisierung	Referenz
pBAD30	L-arabinseregulierter Expressionsvektor; Amp^r	Guzman <i>et al.</i> 1995
pUMR15	pBAD30:: <i>agfD</i> ; Amp^r	Römling <i>et al.</i> 2000
pXZO1	pMAK700:: <i>ΔbcsA</i>	Diese Arbeit
pWJB30	pBAD30:: <i>adrA</i>	Bokranz 2003
pMAK700	enthält temperatursensitives Replikon des Vektors pSU; Cm^r	Hamilton <i>et al.</i> , 1989
pBluescript M13 + /KS	Klonierungsvektor; Amp^r	Stratagene
pKD13	enthält Km-Resistenz Kassete	Datsenko und Wanner 2000
pKD4	enthält Km-Resistenz Kassete	Datsenko und Wanner 2000
pKD3	enthält Cm-Resistenz Kassete	Datsenko und Wanner 2000
pCP20	enthält FLP Recombinase	Datsenko und Wanner 2000
pKD46	enthält das λ Red rekombinase System	Datsenko und Wanner 2000
pXZO63A	pBAD30:: <i>bcsZ</i>	Diese Arbeit

II.8. Mikrobiologische Arbeitsmethoden

II.8.1. Animpfen des Mediums und Inkubations-Bedingungen

II.8.1.1. Animpfen des Mediums

Die Hauptkultur wurde von einer Vorkultur angeimpft um Artefakte durch die Übernacht (ÜN) Kultur zu vermeiden. Das Medium für die Vorkultur wurde aus einer mit dem entsprechenden Bakterienstamm gezogene ÜN-Kultur im Verhältnis 1:100 beimpft und bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde dann im Verhältnis 1:100 das Medium für die Hauptkultur beimpft und entsprechend inkubiert.

II.8.1.2. Inkubation unter aerophilen Bedingungen

Das Medium wurde wie unter II.8.1.1. beschrieben beimpft. Um über das Oberflächen/Volumen Verhältnis einen optimalen Sauerstoffaustausch zu ermöglichen, entsprach die eingesetzte Flüssigkeitsmenge des Mediums einem Zehntel des Fassungsvermögens des Erlenmeyerkolbens. Die Kultur wurde bei einer Temperatur von 28°C oder 37°C und einer Rotation von 210 upm inkubiert.

II.8.1.3. Inkubation unter mikroaerophilen Bedingungen

Auch hier wurde das Medium wie unter II.8.1.1. beschrieben beimpft. Um die Durchlüftung im Kolben einzuschränken, wurde der Kolben zu 60 % mit Medium gefüllt. Die Kultur wurde bei einer Temperatur von 28°C oder 37°C und einer Rotation von 150 upm inkubiert.

II.8.2. Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden als Stammlösungen bei –20°C aufbewahrt und in den in Tab. 3. angegebenen Arbeitskonzentrationen eingesetzt.

Tab. 3. Liste der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml H ₂ O	100 µg/ml
Nalidixinsäure (Nal)	50 mg/ml H ₂ O	50 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	10 mg/ml Methanol	20 µg/ml
Kanamycin (Km)	50 mg/ml H ₂ O	30 µg/ml
Tetracyclin (Tc)	10 mg/ml 70 % Ethanol	20 µg/ml
Gentamycin (Gen)	15 mg/ml H ₂ O	15 µg/ml
Streptomycin (Sm)	30 mg/ml H ₂ O	30 µg/ml

II.8.3. Herstellung von Glycerinstocks

Für die Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerinstocks angelegt. Glycerin lagert sich in die Zellmembranen ein und macht diese geschmeidig, so dass die Zellen infolge der Eisausdehnung beim Einfrieren nicht platzen und somit lebensfähig bleiben. Die Klone wurden auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Bakterien mit einer Impföse von der Platte abgenommen, in ein Schraubverschluss-Gefäß überführt und in 850 µl LB-Medium und 150 µl 87 % Glycerin resuspendiert. Der Bakterienstock wurde bei -70°C eingelagert.

II.8.4. Replika-Technik nach Lederberg

Für eine schnelle Übertragung von vielen Bakterienkolonien auf eine Agarplatte wird die sogenannte Replika-Technik nach Lederberg verwendet [Süßmuth *et al.* 1987].

Der Lederbergstempel besteht aus einem zylinderförmigen Block (Durchmesser etwas kleiner als die Petrischale), über dem ein Stück autoklavierter Samt mit Hilfe eines Gummirings gespannt wird. Auf die Samtfläche wird die Agarplatte mit den Bakterienkolonien gedrückt, so daß auf der Samtfläche ein Kolonienmuster entsteht. Auf die Samtfläche mit dem Kolonienmuster wird dann eine Kongorot (CR)-Agarplatte gedrückt, wobei das Kolonienmuster auf diese übertragen wird.

II.8.5. Prototrophie-Test

Unter Prototrophie versteht man die Fähigkeit von Bakterien alle lebenswichtigen Substanzen selbst zu synthetisieren. Bakterien, die nicht selbst in der Lage sind solche Substanzen zu synthetisieren, nennt man auxotroph [Schlegel 1992].

Eine einzelne Kolonie eines Stammes bzw. einer Mutante wurde auf einer Minimalmedium (MM) Agarplatte ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Auf der MM-Agarplatte wachsen nur prototrophe Kolonien heran, während auxotrophe Varianten nicht wachsen können.

II.8.6. Nachweis der Katalaseaktivität

Das Enzym Katalase ermöglicht die Zersetzung von H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) zu Sauerstoff und Wasser und schützt somit die Bakterien vor dem toxischen Wasserstoffperoxid. Die Expression des Katalase-Genes ist abhängig vom dem Sigmafaktor σ^S (*rpoS*).

Die Bestimmung der Katalaseaktivität wurde durchgeführt um die Funktion von RpoS zu testen. Treten Mutationen im *rpoS* Gen bzw. im komplexen Regulations-netzwerk von RpoS auf, ist folglich keine bzw. deutlich verminderte Katalaseaktivität

nachweisbar [Süßmuth *et al.* 1987]. Die auf Katalaseaktivität zu testenden Stämme wurden zusammen mit entsprechend gewählten Kontrollstämmen auf Agarplatten ausgestrichen und ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien mit einer 4 % H₂O₂-Lösung betropft und die Gasentwicklung beobachtet. Während beim *S. Typhimurium* Wildtypstamm eine heftige Gasentwicklung beobachtet werden konnte, blieb bei *rpoS*-Mutanten auch bei längerer Beobachtung eine Gasentwicklung aus.

II.8.7. Biofilm Bildung

Als Biofilm bezeichnet man allgemein die Anheftung von Bakterien an biotische oder abiotische Oberflächen. Im Biofilm können Bakterien eine extrazelluläre Matrix bilden, die sie umhüllt [Costerton *et al.* 1987].

II.8.7.1. Kongorot (CR)- und Calcoflour (CF) Bindung

Mit Hilfe der Farbstoffe Kongorot (CR)- und Calcoflour (CF) können Hinweise auf eine Produktion der extrazellulären Matrix Komponenten Curli-Fimbrien und Cellulose erhalten werden [Römling *et al.* 1998a].

Die Bakterienstämme wurden auf den CR- und CF-Agarplatten ausgestrichen und bei einer Temperatur von 37°C oder 28°C für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Auf CR-Agarplatten bilden die Cellulose produzierenden Stämme den pdar Morphotyp, während die Curli-Fimbrien produzierenden Stämme den bdar Morphotyp ausbilden. Die CF-Agarplatte wurde unter UV Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) beobachtet. Während die Cellulose produzierenden Stämme aufgrund der Bindung des CF an die Cellulose fluoreszieren, zeigten die Cellulose-negativen Mutanten keine Fluoreszenz.

II.8.7.2. Pellikel Bildung

Pellikel ist eine aus aggregierten Bakterienzellen an der Flüssigkeit/Luft Grenze gebildete Kahlhaut.

In Glasröhrchen wurden 5 ml LB (ohne Salz)-Medium beimpft und stehend bei einer Temperatur von 28°C oder 37°C inkubiert. Nach 72 h wurden die Kulturen visuell auf eine Pellikelbildung untersucht.

II.8.7.3. Cellulase Verdau von Bakterienaggregaten

Inwieweit Cellulose für den Zusammenhalt der Bakterienaggregate der zu testenden Stämme verantwortlich ist, wurde durch deren Behandlung mit Cellulase getestet.

Von einer 24 h bei 37°C inkubierte LB (ohne Salz)-Agarplatte wurden Bakterien abgenommen und in einem 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Auf die Bakterien wurden 1,5 ml 0.05 M Citrat Puffer pH 4,6 und 5 µg/ml Chloramphenicol pipetiert.

Anschließend wurde 0,1 mg/ml Cellulase (Trichoderma viride; Sigma) zugegeben und die Probe unter leichtem Schütteln bis zu 72 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterienaggregate visuell oder mikroskopisch auf Veränderungen untersucht.

II.8.7.4. Proteinase K Verdau von Bakterienaggregaten

Ob die Bakterienaggregaten der testenden Stämme durch proteinöse Filamente wie Curli-Fimbrien zusammengehalten werden, wurde mit Hilfe von Proteinase K untersucht. Bakterien wurden von einer 24 h bei 37°C inkubierten LB (ohne Salz)-Agarplatte geerntet und in einem 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Auf die Bakterien wurden 1,5 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM CaCl₂ und 5 µg/ml Chloramphenicol pipetiert. Anschließend wurde 1,8 mg/ml Proteinase K (Boehringer) zugegeben und unter leichtem Schütteln bis zu 72 h bei 37°C inkubiert. Veränderungen der Bakterienaggregate wurde visuell oder mikroskopisch untersucht.

II.8.7.5. Bakterielle Adhärenz an abiotische Oberflächen

Um die Adhärenz der Bakterien an abiotische Oberflächen zu testen wurden Glasröhrchen und Polystyren ELISA-Platten verwendet.

Bakterielle Adhärenz an Glasröhrchen

Die Glasröhrchen wurden mit 3-5 ml LB (ohne Salz)- oder Minimalmedium gefüllt. Das Medium wurde mit entsprechenden Bakterienstamm beimpft und bei einer Rotation von 150-, 180-, oder 210 upm und einer Temperatur von 37°C oder 28°C für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Die Kultur wurde dann verworfen und die Glasröhrchen 3 x mit PBS gewaschen. Die Glasröhrchen wurden ÜN bei RT getrocknet. Die Röhrchen wurden dann für 10 min mit 0,4 % Kristallviolett (gelöst in Wasser) gefärbt und nach Abgießen des Farbstoffes mehrmals mit Wasser gewaschen. Die Röhrchen wurden ÜN bei RT getrocknet. Der gefärbte, an Glas adhärierende Biofilm wurde anschließend visuell quantifiziert.

Bakterielle Adhärenz an Polystyren ELISA-Platten

Die Öffnungen einer Polystyren ELISA-Platte wurden mit 200 µl LB (ohne Salz)-Medium gefüllt, mit dem entsprechenden Bakterienstamm beimpft und bei einer Temperatur von 37°C oder 28°C für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Die Kultur wurde dann verworfen und die Wells der ELISA-Platte 3 x mit PBS gewaschen. Die Platte wurde ÜN bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Die adhärierenden Bakterien wurden dann für 10 min mit 0,4 % Kristallviolett gefärbt und nach Abgießen des Farbstoffes mehrmals

mit Wasser gewaschen. Die Platte wurde ÜN bei RT getrocknet. Der gefärbte, adhätierende Biofilm wurde anschließend visuell quantifiziert.

II.8.8. Messung der Hydrophobizität

Die extrazelluläre Matrix der verschiedenen Morphotypen hat aufgrund ihrer proteinösen oder zuckerhaltigen Komponenten unterschiedliche Hydrophobizitätsgrade. Die Hydrophobizität wurde mit Hilfe des Kontaktwinkelmesssystems gemessen [Mills und Powelson, 1996]. Eine Flüssigkeit, die einen Festkörper ideal benetzt, breitet sich darauf bis zum Stadium eines monomolekularen Filmes aus ($\Theta = 0^\circ$) (s. Abb. 10. A.). Erfolgt keine Benetzung, beträgt der Kontaktwinkel im Idealfall 180° ($\Theta = 180^\circ$) (s. Abb. 10. B.). Diese Extremwerte werden in der Praxis aufgrund adsorptiver Verunreinigungen unterschiedlicher Art aber nicht erreicht. Je nach Hydrophobizität der gemessene Probe treten in der Praxis Winkel zwischen 0° und 180° auf; hier spricht man von einem „Normalfall“ der Benetzung (s. Abb. 10. C.).

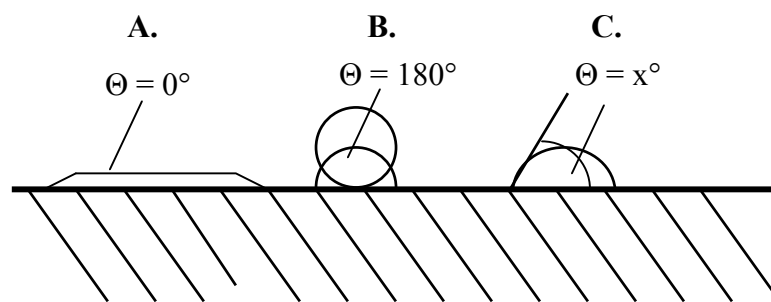


Abb. 10. Drei Formen des Kontaktwinkels. **A.** ideale Benetzung, **B.** keine Benetzung und **C.** "Normalfall" der Benetzung. Weitere Erklärungen s. Text.

Ein Filterpapier wurde auf eine LB (ohne Salz) Agarplatte aufgelegt und mit einer Bakterienkultur des zu testenden Stammes überschichtet. Nach Inkubation über 24 h bei 37°C wurde das mit einem bakteriellen Aufwuchs bedeckte Filterpapier für 30 min bei RT getrocknet. Das Filterpapier wurde dann auf einem Objektträger gelegt und in dem Kontaktwinkelmessgerät (Goniometer) befestigt. Mit einer Spritze wurde ein Tropfen Wasser auf den Filter getropft und dann sofort der Kontaktwinkel gemessen. Höhere Werte des Kontaktwinkels deuten auf höhere Hydrophobizität hin.

II.8.9. Glykogen-Nachweis

Mit Hilfe jodhaltiger Lugolscher-Lösung kann die Glykogenbildung in Bakterien nachgewiesen werden, da Iod in der Lage ist sich in die Helixstruktur des Glykogens einzulagern und somit einen gefärbten Iod-Glykogen-Komplex zu bilden [Govonos *et al.* 1969].

Auf einer Kornberg-Agarplatte wurden die zu testenden Bakterienstämme ausgestrichen und für 24 h bei 37°C oder 48 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml Lugolsche-Lösung auf die Agarplatte gegeben und 2–3 min bei RT inkubiert. Die Bakterienstämme, die Glykogen beinhalten erscheinen dunkel [Romeo *et al.* 1988].

II.8.10. Messung der Cellulase Aktivität

Cellulasen sind β -Glucanohydrolasen, die Carboxymethylcellulose (CMC) abbauen können. In dieser Arbeit wurden die zwei folgenden Methoden angewendet um die Cellulase Aktivität zu testen.

II.8.10.1. CMC-Agar Diffusions Methode

Auf LB (ohne Salz)-Agarplatten, welche 1 % Carboxymethylcellulose (CMC) enthielten, wurden die zu testenden Klone ausgestrichen und für 48 h bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation wurden die Bakterien von der Agarplatte entfernt und die Agaroberfläche mit Wasser gewaschen. Die Agarplatte wurde mit 5 ml einer 0,1 % CR-Lösung für 30 min bei RT gefärbt. Nach Entfernen der CR-Lösung wurde die Agarplatte mit Wasser abgespült und zweimal mit 1 M NaCl gewaschen. Cellulase Aktivität wird durch einen gelblichen Hof auf dem rötlichen Hintergrund angezeigt [Park and Yun 1999].

II.8.10.2. Cellulase Aktivität in CMC-SDS-Polyacrylamid Gelen

Von einer 24 h bei 37°C inkubierte Agarplatte geerntete Bakterien wurden in 100 mM Tris-HCl pH 7,0 resuspendiert und dreimal für drei sec bei 4°C mit Ultraschall behandelt. Der Zellextrakt wurde dann mit SDS-Probenpuffer (1:1) gemischt, für 3 min auf 95°C erhitzt und dann auf ein mit 0,1 % CMC ergänzten SDS-Polyacrylamid Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in 250 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,0 + 1 % Triton X-100 – Bad gelegen und ca. 20 h bei RT inkubiert. Der Puffer wurde während dieser Zeit 2 - 3 x gewechselt. Nach einem weiteren Inkubationsschritt von ca. 20 h bei 37°C im 10 mM Tris-HCl pH 7,0- Bad, wurde das Gel für 15 min bei RT mit CR (0,5 %) gefärbt. Das Gel wurde anschließend in 1 M NaCl für 15 min gewaschen. Protein Banden mit Cellulase Aktivität zeigten sich als gelbliches Fragment auf dem rötlichen Hintergrund [Park and Yun, 1999].

II.8.11. Messung der Genexpression: β - Galaktosidasetest

Mit Hilfe der β -Galaktosidaseaktivitätsmessung kann man den Grad der Expression eines Gens bestimmen [Miller 1972].

Zu bestimmten Zeiten wurde einer Bakterienkultur ein Aliquot entnommen, pelletiert und in Arbeitspuffer auf eine OD_{600 nm} von 0,4-0,5 eingestellt. Die Proben wurden auf Eis gelagert. Je 2 x 10 µl, 30 µl und 100 µl einer Probe wurden mit Arbeitspuffer auf 1 ml aufgefüllt. Anschließend wurden zwei Tropfen Chloroform sowie 20 µl 0,1 % SDS in jedes Reaktionsgefäß gegeben, 5 sec geschüttelt und dann 10 min bei RT inkubiert. Mit Zugabe von 0,2 ml ONPG (4 mg/ml) als Substrat für das Enzym wurde die Reaktion gestartet. Die Proben wurden gut geschüttelt und der Startzeitpunkt wurde notiert. Es folgte eine Inkubation der Proben im Wasserbad bei 28°C bis die Proben eine deutlich gelbe Farbe zeigten (OD_{420 nm} = 0,1–0,4). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Na₂CO₃ Lösung gestoppt (Stoppzeitpunkt wurde notiert). Anschließend wurden jeweils 175 µl eines Reaktionsansatzes in einer ELISA-Platte pipettiert und die OD_{420 nm} und OD_{550 nm} gemessen. Für die Berechnung der β-Galaktosidaseaktivität wurde ebenfalls die OD_{660 nm} der Ausgangssuspension bestimmt. Als Maß für den Grad der β-Galaktosidaseaktivität wurden aus diesen Werten die Miller-Einheiten wie folgt berechnet: Miller-Einheiten = $1000 \times [OD_{420 \text{ nm}} - (1,75 \times OD_{550 \text{ nm}})] / (t[\text{min}] \times V[\text{ml}] \times OD_{660 \text{ nm}})$. Miller-Einheiten = $[\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}_{\text{Protein}}]$.

II.8.12. Proteinase K Verdau ganzer Bakterienzellen

10 mg Bakterien wurden von einer 24 h bei 37°C inkubierten Agarplatte geerntet und in 1 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM CaCl und 40 µg/ml Cm resuspendiert. Ein Aliquot von 200 µl wurde mit Proteinase K (200, 500 und 1000 µg/ml) für 2 h bei 37°C verdaut. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 10 % Tetrachloracetat (TCA) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Pellet wurde durch Zentrifugation bei 12000 x g für 5 min gewonnen, mit 70 % Ethanol gewaschen und danach getrocknet [Loferer *et al.* 1997]. Das getrocknete Pellet wurde in 80 µl Auftragspuffer resuspendiert, 5 min auf 95°C erhitzt und dann 7 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen.

II.8.13. Permeabilisierung der Bakterienzellen

10 mg Bakterien wurden von einer 24 h bei 37°C inkubierten Agarplatte geerntet, 2 x mit 10 mM Tris-HCl pH 8,0 bei 4°C gewaschen und dann in 1 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 20 % Saccharose; 10 mM EDTA resuspendiert. 0,5 mg/ml Lysozym wurden langsam unter die Oberfläche der Flüssigkeit pipetiert, um die Aggregatbildung der Spheroplasten zu reduzieren. Die Proben wurden dann für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben bei 3000 upm zentrifugiert [Sprott *et al.* 1994]. Das gewonnene Pellet wurde in 10 µl eiskaltem Wasser resuspendiert; dazu wurde dann 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM CaCl Puffer (1 x) und Proteinase K in verschiedenen

Konzentrationen (200, 400 und 600 µg/ml) gegeben. Die weiteren Schritte sind unter II.8.12. beschrieben.

II.8.14. Cellulose-Nachweis durch Elektronenmikroskopie (EM)

(Durchgeführt von Dr. H. Lünsdorf und Dr. M. Rohde)

II.8.14.1. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Bei der REM wird eine Probe mit einem Elektronenstrahl beschossen. Der Elektronenstrahl tastet die Probe in einem Raster Zeile für Zeile und Spalte für Spalte ab. Synchron dazu tastet der Elektronenstrahl des Bildschirms die Bildpunkte ab und bildet dabei die Anzahl der gemessenen Elektronen als Helligkeitswerte ab [<http://fachberatung-biologie.de/mikroskop>]. Um die Ultrastruktur der Probe zu erhalten, wurden sie mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert. Aldehyde bilden Brückenbindungen zwischen den Aminogruppen der Proteinmoleküle aus. Osmiumoxid dient zur Erhöhung der Oberflächenleitfähigkeit des Präparates. Nach gründlichem Waschen mit Wasser wurde die Probe dann entwässert. Das Wasser der Probe wurde stufenweise durch erhöhte Konzentrationen von Aceton (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und 100 %) ersetzt. Das fixierte und entwässerte Präparat wurde schließlich mittels eines Kritischen-Punkt-Trocknungsgerätes getrocknet, auf (für REM passende) Träger (Aluminiumhalter) übertragen dort befestigt und analysiert [Lünsdorf *et al.* 1997].

II.8.14.2. Die Schrägbedampfungs – Methode

Die Gefrierbruch Technik ist die Präparationsmethode, die es ermöglicht, topografische Ansichten der bakteriellen Zellwand und Ultrastrukturdaten von Zellen zu gewinnen [Lünsdorf *et al.* 1997]. Die Probe wurde erst mit flüssigem Stickstoff eingefroren und dann „verätzt“. Bei der „Verätzung“ handelt es sich um eine Sublimation des gefrorenen Wassers in und ausserhalb der aufgebrochenen Zellen. Anschließend erfolgte die Schrägbedampfung erst mit Platin für 30 sec unter einem Winkel von 45°, und danach mit Kohle senkrecht von oben (90°) für 75 sec. Nach Säubern des Präparates mit 70 % Schwefelsäure und danach mit Wasser, wurde dies im EM betrachtet.

II.8.14.3. Die Ultradünnschnitt – Methode

Die Ultradünnschnitte wurden mit Hilfe eines Ultramikrotomes hergestellt. Die Ultradünnschnitte ermöglichen dem Licht das Präparat zu durchdringen und die Zellen unter dem EM nebeneinander zu sehen [Lünsdorf *et al.* 1997]. Die Bakterien wurden erst im Wasseragar immobilisiert und dann mit Glutaraldehyd für 1 h bei 0°C fixiert. Nach 3 x Waschen mit PBS für jeweils 10 min bei RT erfolgte eine weitere Fixierung

der Probe mit Osmiumoxid. Die Entwässerung der Probe wurde wie unter II.8.14.1. beschrieben durchgeführt. Anschliessend wurde die Probe im Kunstharz bei 70°C UN polymerisiert und im Ultramikrotom geschnitten.

II.8.14.4. Die Negativ-Kontrastierungs – Methode

Negativ-Kontrastierung wird erreicht indem das Kontrastmittel das Objekt äusserlich umhüllt aber nicht eindringt. Damit bleibt das Objekt elektronentransparent und erscheint als helle Struktur in einer dunklen, weniger elektronentransparenten Umgebung [Lynsdorf *et al.* 1997]. Mit einem Kohlefilm wurde die Probe von einer Suspension adsorbiert. Der mit Probe Partikeln beschichtete Kohlefilm wurde mit Wasser gewaschen und dann auf Kontrastmittellösung (Ammoniummolybdat-Uranylacetat) übertragen. Das überschüssige Kontrastmittel wurde mit Filterpapier abgesaugt und getrocknet. Das getrocknete Präparat wurde dann im EM analysiert.

II.9. Biochemische Methoden zur Cellulose Detektion

II.9.1. Isolierung von Cellulose nach der Updegraff-Methode

Bei der Verwendung dieser Methode werden die Bakterien unter hohen Temperaturen mit Säure behandelt. Unter diesen Bedingungen werden alle anderen Substanzen mit Ausnahme kristalliner Cellulose hydrolysiert [Updegraff 1969].

Ca. 30 mg Bakterien wurden von einer 24 h bei 37°C oder 48 h bei 28°C inkubierten LB (ohne Salz) Agarplatte geerntet, in 1,5 ml Essig-Salpetersäure-Lösung resuspendiert und für 30 min schüttelnd bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 13.000 upm zentrifugiert (Biofuge A; Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 3 x mit je 1 ml Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in ca. 80 µl Wasser resuspendiert und in ein Glasgefäß (Wheaton Vial) überführt. Die Glasgefäße waren zuvor durch Inkubation in konzentrierter Chromschwefelsäure (24 h) und anschließendem gründlichen Spülen mit Wasser gereinigt worden. Die in den Glasgefäßen befindlichen Proben wurden bei -70°C eingefroren und lyophilisiert. Die getrockneten Pellets wurden mit 4 N Trifluoressigsäure (TFA) drei Tage bei 100°C inkubiert, um die Cellulose in ihre Glukoseeinheiten aufzuspalten. Die Glukose wurde mittels Gaschromatographie detektiert.

II.9.2. Isolierung von Cellulose mit SDS

Ca. 30 mg Bakterien wurden von einer 24 h bei 37°C oder 48 h bei 28°C inkubierte LB (ohne Salz) Agarplatte genommen und in 1,5 ml TE + 2 % SDS resuspendiert und für 45 min unter starkem Schütteln bei 95°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei

13.000 upm (Biofuge A; Heraeus), wurde das Pellet 3 x mit Wasser gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in einer geringen Menge Wasser aufgenommen und für die Mikroskopie bereitgestellt oder im Falle der GC/MS Analyse lyophilisiert und wie unter II.9.1. beschrieben behandelt.

II.9.3. Isolierung von Cellulose mit SDS + Mercaptoethanol

Ca. 30 mg Bakterien wurden in 1,5 ml TE + 2 % SDS + 1 % Mercaptoethanol resuspendiert und für 1 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13.000 upm (Biofuge A; Heraeus) wurde das Pellet 3 x mit Wasser gewaschen und dann mit DNase (0,7 mU/μl) und RNase (0,38 mg/ml) für 1 h bei 37°C verdaut (Puffer: 0,2 M Natriumacetat pH 4,5; 0,1 M Magnesiumchlorid und 0,1 M Natriumchlorid, gelöst in Wasser). Nach anschließender Zentrifugation wurde das Pellet 3 x mit Wasser gewaschen und dann mit Proteinase K (1,8 mg/ml in ES (0,5 M EDTA, 1 % N-Lauroylsarcosine pH 9,5) ÜN bei 37°C verdaut. Nach dem Waschen des Pellets mit Wasser, erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit Chloroform/Methanol (1:1). Anschließend wurde das Pellet 2 x mit Aceton und 3 x mit Wasser gewaschen und für die EM bereitgestellt.

II.9.4. Isolierung von Cellulose mit NaOH

Ca. 30 mg Bakterien wurden von einer 24 h bei 37°C oder 48 h bei 28°C inkubierten LB (ohne Salz)-Agarplatte geerntet, in 1,5 ml 0,1 M NaOH resuspendiert und für 45 min schüttelnd bei 80°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13.000 upm (Biofuge A; Heraeus) wurde das Pellet ein zweites Mal in 0,1 M NaOH inkubiert. Nach Zentrifugation und 3 x Waschen des Pellets mit Wasser, wurde dieses mit Proteinase K (1,8 mg/ml) für 1 h bei 37°C verdaut. Anschließend wurde das Pellet 3 x mit Wasser gewaschen und schließlich in einer geringen Menge Wasser aufgenommen und für die EM bereitgestellt oder im Falle der GC/MS Analyse lyophilisiert und wie unter II.9.1. beschrieben behandelt.

II.9.5. Gaschromatographie **(Durchgeführt von Dr. M. Nimtz)**

II.9.5.1. Benötigte Reagenzien

1. Methanolische HCl (0,625 M): Herstellung durch Eintropfen von 4,4 ml Acetylchlorid in 100 ml Methanol unter Rühren und Eiskühlung. 2. Methylacetat, tertiäres Butanol, Methanol, Pyridin, Cyclohexan. 3. Trimethylsilylierungsreagenz:

Bis(trimethylsilyl)tri-fluoracetamid (BSTFA) versetzt mit 1 % Trimethylchlorsilan. Zur Standardisierung wurden jeder Probe 100 ng meso-Inositol beigemischt.

II.9.5.2. Derivatisierung der Monosaccharide

Nach der Säurehydrolyse wurden die entstandenen Monosaccharidreste durch Erhitzen mit methanolischer HCl in die entsprechenden Methyl-Glykoside überführt. Die Proben wurden zunächst im Exsikator über P₂O₅ getrocknet. Danach wurden 200 µl methanolische HCl und 50 µl Methylacetat zugegeben. Nach gutem Durchmischen wurden die Proben für 16 h bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl tertiäres Butanol zugegeben, um überschüssige HCl zu entfernen (Umsetzung zu tertiärem Butylchlorid und Wasser). Die Lösungsmittel wurde dann mittels Stickstoff abgeblasen.

II.9.5.3. Trimethylsilyllierung

Dieser Schritt ist notwendig, um die Glukose für die Gaschromatographie (GC) hinreichend flüchtig zu machen. Die Proben wurden mit 100 µl Pyridin und 50 µl BSTFA versetzt und für 1 h bei 70°C inkubiert. Das Derivatisierungsgemisch wurde im Verhältnis 1:2 mit Cyclohexan verdünnt und 1 µl dieser Lösung in den Injektor des Gaschromatographen gespritzt.

II.9.5.4. Gaschromatographie

Verwendung fand eine unpolare 30 m DB5-Kapillarsäule (Finnigan) mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm. Folgendes Temperaturprogramm wurde eingesetzt: 3 min isotherm bei 80°C, danach 10 grd/min bis 300°C. Als Trägergas diente Helium. Das meso-Inositol diente hierbei als Standard [Chaplin 1982, Chaplin und Kennedy 1986]. Detektiert wurde mit einem Ionenfallenmassenspektrometer (GCQ) der Firma Thermo-Finnigan.

II.10. Methoden der Proteinanalyse

II.10.1. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) dient der Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen [Bertram und Gassen, 1991]. Die in diese Arbeit verwendete Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid-Gelen verschiedener Konzentration ist Tab. 4. zu entnehmen.

Tab. 4. Zusammensetzung von SDS-Gelen verschiedener Konzentration.

	12 % Trenngel	15 % Trenngel	4 % Sammelgel
40 % Acrylamid (37:1; Roth)	3,00 ml	3,75 ml	0,50 ml

1,5 M Tris pH 8,8	2,50 ml	2,50 ml	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	-	1,25 ml
10 % SDS	0,10 ml	0,10 ml	0,15 ml
H₂O	4,35 ml	3,60 ml	3,20 ml
25 % APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

II.10.1.1. Molekulargewichtsmarker

Als Molekulargewichtsmarker dienen der Rainbow-Marker (Biorad; Kat-Nr. 161-0324) sowie der Multi-Mark Standard (Novex; Kat-Nr. LC 5725). Hiervon wurden jeweils 5 µl eingesetzt.

II.10.1.2. Färben von Gelen

Die Gele wurden mit Coomassie- oder mit Colloidal-Lösung (s. Kap. II.6.) für mindestens 1 h unter Schütteln gefärbt und anschließend für 2-3 Stunden auf dem Schüttler mit gelegentlichem Wechsel der Entfärberlösung (Coomassie Färbung) bzw. des Wassers (Colloidal Färbung) entfärbt. Die im Gel aufgetrennten Proteine waren nach Entfärben des Geles gut sichtbar.

II.10.2. Western Blotting

Mit Hilfe dieser Methode werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-(Polyvinylidendifluorid) Membran übertragen [Bertram und Gassen, 1991]. Das Gel, die PVDF-Membran und vier Stücke Whatman-Papiere wurden für 10-15 min in 1 x Blotpuffer gelegt. Die PVDF-Membran wurde zuvor in Methanol aktiviert. Die Blotapparatur wurde so aufgebaut, dass erst zwei Whatman-Papiere auf die Kathodenplatte aufgelegt wurden, dann wurde das Gel und auf das Gel die PVDF-Membran aufgelegt. Es folgten zwei weitere Whatman-Papiere und schließlich die Anodenplatte. Die Apparatur wurde mit ca. 300 g beschwert und anschließend für 1 h bei 120 mA (2 mA/cm^2 Membranfläche) geblottet. Nach dem Blotten wurde die Membran in Blocking-Lösung ((BL) 5 % Magermilch in TBS-T) gelegt um die unspezifischen Bindungsstellen abzublocken. Die immobilisierten Proteine wurden mit den entsprechenden ersten Antikörper (1. AK; s. Tab. 5.) für 1 h schüttelnd bei RT inkubiert. Nachdem der überschüssige 1. AK mit TBS-T abgewaschen wurde, erfolgt die Inkubation des Blots mit dem zweiten Antikörper (2. AK; s. Tab. 5.). Nach dem Inkubationsschritt von 30 min mit dem 2. AK, wurde die Membran in vier jeweils 10 min dauernden Waschschritten in TBS-T gewaschen. Als Nachweissubstanz wurde Lumilight (Roche; Kat-Nr. 2015200) verwendet. Die

Chemilumineszenz wurde durch Exposition auf einen hochempfindlichen Film (Kodak X-OmatTM; Kat-Nr. 618127) nachgewiesen.

Tab. 5. Die verwendeten Antikörper.

Protein	1 AK	Verdünnung	2 AK	Verdünnung
CsgA	α -CsgA	1:2000 in 5 % BL	α -Kaninchen-IgG	1:2000 in 5 % BL
CsgD	α -csgD	1:2000 in 5 % BL	α -Kaninchen-IgG	1:2000 in 5 % BL
BcsZ	α -BcsZ	1:2000 in 5 % BL	α -Kaninchen-IgG	1:2000 in 5 % BL
DsbA	α -DsbA	1:20000 in 5 % BL	α -Kaninchen-IgG	1:2000 in 5 % BL
DnaK	α -DnaK	1:3000 in 5 % BL	α -Maus-IgG	1:2000 in 5 % BL

(Die Antikörper wurden entnommen aus dem Laborbestand. Sie sind polyklonal und wurden entweder gegen das gesamte Protein (CsgA, DsbA, DnaK) oder gegen Peptidsequenzen (CsgD, BcsZ) hergestellt).

II.10.3. Aufreinigung Polyklonaler Antikörper

2 g CNRr-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) wurde nacheinander in 100 ml H₂O, 200 ml 5 mM HCl und in 200 ml Boratpuffer (0,1 M Borsäure, 0,5 M NaCl; pH 8,4) für 2 h inkubiert. Parallel dazu wurden 5 mg Peptid erst in 1 ml Wasser aufgelöst und dann auf 4 ml mit PBS aufgefüllt. Anschliessend wurden 4 ml vorbereitete Sepharose mit dem aufgelösten Peptid gemischt und über Nacht bei RT rotierend inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 x g und Waschen mit 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (3 x), wurden auf das Sepharose/Peptide-Gemisch 8 ml Tris-HCl, pH 8,8, gegeben und rotierend 1 h bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation und Waschen mit PBS wurde das Gemisch auf PD-10 Säulen (Amersham Biosciences) übertragen. Anschliessend wurden auf die Säule 25 ml Antiserum geladen. Der Durchfluss wurde 3 x auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 30 ml 0,1 M Acetatpuffer (0,1 M Essigsäure, 0,5 M NaCl; pH 4,8) gewaschen. Der gebundenen Antikörper wurde nun mit 30 ml 0,2 M Acetatpuffer (0,2 M Essigsäure, 0,5 M NaCl; pH 2,5) in 20 Fraktionen eluiert. Ein weiterer Elutionsschritt wurde mit 100 mM Triethylamine, pH 11,5 durchgeführt. Die Eluate wurden mit 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 bzw pH 4,5 neutralisiert. Nach Messung der OD bei 280 nm wurden die Fraktionen mit höheren Proteine Mengen selektiert und gesammelt. Die Umstellung der Elutionspuffer auf PBS-Puffer wurden durch Centricon-Säulen (YM-30, Millipore) erreicht. Die Centricon-Säulen wurden nach Vorschrift des Herstellers benutzt.

II.10.4. CsgA Detektion

II.10.4.1. Anreicherung von CsgA

In polymerisierter Form bildet CsgA die Hauptuntereinheit der Curli und ist als solches unlöslich. Eine Depolymerisation von CsgA wird durch Behandlung der Proben mit 98 % Ameisensäure möglich [Collinson *et al.* 1996].

5 mg Bakterien wurden in 1,5 ml TE- Puffer + 2 % SDS resuspendiert und anschließend für 45 min stark schüttelnd bei 95°C inkubiert. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 13.000 upm (Biofuge A; Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 3 x mit 1 ml Wasser gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet bei -70°C eingefroren und lyophilisiert. Zu dem getrocknen Pellet wurden 20–40 µl 98 % Ameisensäure gegeben und die Tubes für 10 min auf Eis gestellt. Die Ameisensäure wurde dann im Vakuumtrockner eingedampft [Römling *et al.* 1998].

II.10.4.2. CsgA Detektion im Coomassiegel und mittels Western Blot

Die CsgA angereicherte Probe (s. Kap. II.10.4.1.) wurde in 20 µl SDS-Auftragspuffer resuspendiert und im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die CsgA-Detektion erfolgte durch Färben des Geles mit Coomassie bzw Colloidal-Coomassie Lösung (dabei wurde das aufgereinigte CsgA Protein als Kontrolle benutzt) oder durch Western Blotting mit Hilfe des α -CsgA Antikörpers.

II.10.5. Sequenzierung von CsgA durch Q-TOF

II.10.5.1. Q-TOF

Bei der Q-TOF sind drei Quadrupole, an denen ein elektrisches Feld angeschlossen ist, hintereinander geschaltet und wirken als ein Massenfilter. Das erste Quadrupol trennt die Analytionen nach ihren Massen. Im zweiten Quadrupol werden bestimmte Peptide weiter fragmentiert, die dann im dritten Quadrupol nach ihren Massen aufgetrennt werden. Die Quadrupole sind an MALDI/TOF-MS angeschlossen. Diese Technik ermöglicht die Sequenzierung der Peptide.

II.10.5.2. Aufarbeitung der Proben

Alle hier beschriebene Schritte wurden mit Wasser gewaschenen Handschuhen durchgeführt. Das gewünschte Protein Fragment wurde aus dem Coomassie gefärbten Gel ausgeschnitten, in kleine Stücke zerlegt und in einen Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Waschen der Gelstücke mit Wasser wurden diese mit Acetonitril überschichtet und bei RT für 15 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Gelstücke in der SpeedVac getrocknet. Eine Rehydrierung für 30 min bei 56°C erfolgte

durch Zugabe von 150 µl 20 mM DTT, 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung auf die getrockneten Gelstücke. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Gelstücke wurden wiederum mit Acetonitril dehydriert. Eine zweite Rehydrierungsschritt für 30 min bei RT im Dunkeln erfolgte durch Zugabe von 150 µl 55 mM Iodacetamid, 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung. Die Probe wurde zentrifugiert und das Iodacetamid vollständig verworfen. Anschließend wurden die Gelstücke in 200 µl 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung gewaschen und dann wie vorher mit Acetonitril überschichtet, zentrifugiert und getrocknet. Die getrockneten Gelstücke wurden dann mit Trypsin ÜN bei 37°C verdaut. Die Extraktion der Peptide wurde dann folgendermaßen erreicht: auf die Verdau Reaktion wurden 15 µl 25 mM NH_4HCO_3 -Lösung gegeben für 15 min bei 37°C schüttelnd inkubiert; dann wurden 50 µl Acetonitril zugegeben und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand gesammelt. Die Gelstücke wurden mit 50 µl 5 % Ameisensäure versetzt und 15 min bei 37°C schüttelnd inkubiert; nach der Acetonitril Behandlung wurde der Überstand mit dem vorherigen vereinigt und im SpeedVac eingengt. Die gewonnenen Peptide wurden für Q-TOF mit Hilfe von C18ZipTip-Säulen aufgereinigt. Die ZipTip-Aufreinigung basiert auf der Reversed-Phase-Chromatographie (RPC). Die Peptide wurden in 15 µl 0,5 % Ameisensäure, 5 % Methanol gelöst. C18ZipTips wurden erst mit 65 % Methanol, 0,5 % Ameisensäure gewaschen und anschließend mit 5 % Methanol 0,5 % Ameisensäure äquilibriert. Mit dem äquilibrierten C18ZipTip wurde dann die Probe 10 x langsam ab- und auf pipetiert. Nach 3 x Waschen mit 5 % Methanol, 0,5 % Ameisensäure Lösung wurden die Peptide mit 6 µl 65 % Methanol, 0,5 % Ameisensäure aus den C18ZipTip-Säulen eluiert [Shevchenko *et al.* 1996].

II.11. Methoden der DNA – Analyse

II.11.1. Die verwendeten Kits

Isolierung von chromosomaler DNA erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin Tissue-Kitts von Machery – Nagel (Kat-Nr. 740952.50). Für die Isolierung von Plasmid DNA wurden GFXTM Micro Plasmid Prep Kitt (Kat-Nr. 27-9601-02) von Amersham-Pharmacia Biotech Inc oder QIAprep Spin Miniprep Kitt von Qiagen (Kat-Nr. 12145) verwendet. Die Isolierung und Aufreinigung der DNA aus einem Gel wurde mit dem Gene-Clean-II-Kitt (Bio; Nr. 1001-400) oder mit Hilfe des QIAquick-PCR-Purification-Kitts (Qiagen; Nr. 28106) durchgeführt. Bei der Durchführung der Agarosegelelektrophorese wurde als Größenstandard die Smartladder (Eurogentec; Kat-Nr. MW-1700-10) als DNA-Marker benutzt. Für Sequenzierreaktionen wurde der BigDyeTM v.3.0 der

Firma Applied Biosystems verwendet. Agarosegelelektrophorese, Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Ligation wurden nach DNA-Standard Methoden entsprechend durchgeführt [Sambrook *et al.* 1989].

II.11.2. DNA - Primer

Die während dieser Arbeit verwendeten Primer sind in der Tab. 6. aufgelistet.

Tab. 6. Liste der verwendeten Primer.

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Besonderheiten	Funktion
MudOut	CCGAATAATCCAATGTCCTCCCGGT	MudJ - Primer	Identifizierung des unbekannten Genes
MudTaq	AGTGCGCAATAACTTGCTCTCGTTC	MudJ - Primer	Identifizierung des unbekannten Genes
YHJO5	GGAGGATCCTGCCATATTCGCCTTCATCAG	BamHI-Schnittstelle	<i>bcsA</i> - Inframe-Deletion
YHJO6	CCTCTGCAGCGCCAGTATCAGTGA AAAGGT	PstI-Schnittstelle	<i>bcsA</i> - Inframe-Deletion
YHJO7	CCACTGCAGGATATTCTGAAGCTGGCTTC	PstI-Schnittstelle	<i>bcsA</i> - Inframe-Deletion
YHJO8	CCAAAGCTTTCGCATTGCGATCCG GCAG	HindIII-Schnittstelle	<i>bcsA</i> - Inframe-Deletion
YHJQ1	GAACCACATCTCTCACCGCAG		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJQ2	CGCCTGGATAGCCGATCCGA		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJO9	CGTTATAGCTGGATTTTACTGG		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJO18	GGATCTAGAGATCCATCGCGATGAGGCGAT		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJ20	GCGCATACCGGCGGGATAA		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJO15	GGTACTAGTCCGGCCCGTTACCTCATTC		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJO1	CGAAGACCTTAATGTGGTCAA		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJO2	GGTTATAGAAGACCCACACC		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJ21	GCGGCGATACAGCCGTCG		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJO16	CCAGAATTCCAGCATTGATCAATGGCGGC		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJO10	GGTTCATCATCTCGATAACCG		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJ22	CTGGTTATTCAGACTGATATCC		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJ25	CGAATCACCCGGTGCTGCT		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJ24	GAGCATCGTTATCCATCCGC		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJL3	CCAGGATCCTGGCAGCGATGCCTATTACAAC		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJ26	GAGAAACGCCCTTTTGCC		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YhjL1	TGAGGACTTAGTCCGTCAGT		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJ11	TATCGCCTGGAGCTGATCGA		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
YHJL12	CTGCGTTCGATATCGTCGAT		Amplifikation des

			<i>bcsABZC</i> -Operons
YHJ23	AGCTCCAGTCGAGTGGGCT		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
AGFA60	CGGCCATTGTTGTGATAAATG		Amplifikation des <i>csgA</i>
AGFA66	ATGATGTTAACAATACTGGGTGC		Amplifikation des <i>csgA</i>
AGFA2	GGTTAGCGGTGGCGTTGTTTGC		Amplifikation des <i>csgA</i>
AGFA24	GGCAGCATTTGCAGCAATCG		Amplifikation des <i>csgA</i>
EC-AGFD1	CAGCAGTGCAACATCTGTCAG		Amplifikation des <i>csgDEFG</i> -Operons
EC-AGFD2	AAAGTCTGGAAAATAACGTCCTG		Amplifikation des <i>csgDEFG</i> -Operons
FEC-IRD	GATCAACAATAATGTATGACCA		Amplifikation der intergenischen Region zwischen <i>csgD</i> und <i>csgB</i>
FEC-IRB	GCTGCCTGATTAAATGAAGAC		Amplifikation der intergenischen Region zwischen <i>csgD</i> und <i>csgB</i>
BCSA74A	CTTCCGTATTGGCAGTCAGGTTTCAG GACG		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
BCSA70	GCGCCAGCGGGTTAAACGGCTG		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
BCSA74	GCAACAGATTCAATTTCTGCCCTTC		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
BCSA86	GCACCCGCGCTGGCAGCGTATTCG		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
BCSA68	CTGAATCTTCGAGTTGGTCAGGC		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
BCSA62	TGGGTCTTCTACAACCTGATTA		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
BCSA62A	GCGGCGGTGCAATTTGCGCAAAGG T		Amplifikation des <i>bcsABZC</i> -Operons
ES-BCSA162	GACGATCTCTACCAGGTCTGG		Amplifikation des <i>bcsA</i> -Genes bei <i>E. sakazakii</i>
ES-BCSA681	GTAACGCCACCAGATATAGCGG		Amplifikation des <i>bcsA</i> -Genes bei <i>E. sakazakii</i>
BcsZ-A	TCC TCTAG AGACCATGAGTAACGC ATGATGACTATG	XbaI-Schnittstelle	Amplifikation des <i>bcsZ</i> -Genes für die Klonierung in pBAD30
BcsZ-B	TCC AAGCTT TTAATGATGATGATGA TGATGATGATG ACGTGAACCTACG CATTCCTG	HindIII-Schnittstelle Poly-His-tag	Amplifikation des <i>bcsZ</i> -Genes für die Klonierung in pBAD30
EC-BCSA-ATG	ATGATCCTGACCCGGTGGTGGCTTA TCCCGCCGGTCAAC GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC	Sequenz am Start Bereich der Cm-Kassette (pKD3)	Herstellung der <i>bcsA</i> -Mutante via [Datsenko und Wanner, 2000].
EC-BCSA-TGA	TCATTGTTGAGCCAAAGCCTGATCC GATGGTTGTGCCGT CATATGAATA TCCTCCTTAGT	Sequenz am Stop Bereich der Cm-Kassette (pKD3)	Herstellung der <i>bcsA</i> -Mutante via [Datsenko und Wanner, 2000].
EC-AGFD-Start	ATGTTTAATGAAGTCCATAGTATTC ATGGTCATACATTATTGTTGATCAC GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Sequenz am Start Bereich der Cm-Kassette (pKD3)	Herstellung der <i>csgD</i> -Mutante via [Datsenko und Wanner, 2000].
EC-AGFD-Stop	TTATCGCCTGAGGTTATCGTTTGCC CAGGAAACCGCTTGTGTCCGGTTTT CATATGAATATCCTCCTTAGT	Sequenz am Stop Bereich der Cm-Kassette (pKD3)	Herstellung der <i>csgD</i> -Mutante via [Datsenko und Wanner, 2000].
BcsZ-Start	ATGACTATGCTGCGCGGATGGATA ACGATGCTCGTCATG CGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC	Sequenz am Start Bereich der Cm-Kassette (pKD3)	Herstellung der <i>bcsZ</i> -Mutante via [Datsenko und Wanner, 2000].
BcsZ-Stop	TTAACGTGAACCTACGCATTCCTGG CCCAGTCAGGTAAT CATATGAAT ATCCTCCTTAG	Sequenz am Stop Bereich der Cm-Kassette (pKD3)	Herstellung der <i>bcsZ</i> -Mutante via [Datsenko und Wanner, 2000].

II.12. Klonierungen und Herstellung von Mutanten

II.12.1. Transformation

Die Genübertragung durch freie, lösliche DNA, die aus einem Spender-Bakterium freigesetzt oder daraus extrahiert worden ist, auf ein Empfänger-Bakterium bezeichnet man als Transformation [Schlegel 1992]. Für die Transformation wurden in dieser Arbeit chemokompetente- oder elektrokompente Zellen verwendet.

II.12.1.1. Transformation mit chemokompetenten Zellen

Bei dieser Methode werden die Zellwände der Bakterienzellen durch Ca^{2+} -Ionen für DNA durchlässig gemacht. Durch kurzfristiges Erwärmen wird die Aufnahme von Vektor-DNA begünstigt.

Herstellung chemokompetenter Zellen (SEM-Zellen)

250 ml einer Flüssigkultur, die in LB- oder SOB-Medium bei 18°C und 220 upm unter aerophilen Bedingungen angezogen wurde, wurde bei einer $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ von 0,6 für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Kultur bei 6000 upm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 ml eiskaltem TB resuspendiert und für 10 min im Eisbad inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 20 ml TB resuspendiert. Unter sanftem Schütteln wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) bis zu einer Endkonzentration von 7 % langsam hinzugegeben und 10 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in 450 µl-Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren [Inoue *et al.* 1990].

Transformation:

Auf 200 µl chemokompetente Zellen wurden 5 µl (10-20 ng) Plasmidlösung hinzugefügt und für 30 min im Eisbad inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 30 sec. Anschließend wurde der Ansatz wieder auf Eis gestellt. Danach wurden 0,8 ml SOC-Medium hinzupipettiert. Der Ansatz wurde bei 37°C oder 28°C für 1 h schüttelnd inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 3000 upm (Megafuge 3.0R; Heraeus) für 5 min. 800 µl des Überstandes wurden abgenommen, das Pellet im restlichen SOC-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte ausplattiert. Die Selektion erfolgte über Antibiotikaresistenzen.

II.12.1.2. Transformation mit elektrokompenten Zellen

Bei der Elektroporation werden, durch Anlegen einer elektrischen Spannung die Bakterienzellwände porös, wodurch Fremd-DNA in die Zellen gelangen kann.

Herstellung elektrokompeter Zellen

Eine bis zu einer OD_{600 nm} von 0,6 gewachsene Bakterienkultur wurde für 15 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Suspension in einen kalten Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 6000 upm (SC-5B; Sorvall; Rotor: SS-34) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 4 x mit eiskaltem Glycerin (15 %) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in Glycerin (ca. 1/1000 des Ausgangsvolumens) resuspendiert und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Diese wurde dann in einem Trockeneis-Ethanol-Bad schockgefroren wurden. Die so aufkonzentrierte Zellsuspension wurde bei -70°C gelagert.

Transformation:

Der Elektroporator wurde zunächst auf folgende Parameter eingestellt: Spannung 1,3 kV; Kapazität 25 µF und Innenwiderstand 400 Ω. 50 µl elektrokompeter Zellen wurden in eine 0,1 ml Elektroporationsküvette (Biorad) gegeben und 1 µl DNA-Lösung wurden hinzupipettiert. Nun wurden die Zellen einem Stromstoß von etwa 1 sec ausgesetzt und die Küvette hinterher wieder auf Eis gestellt. 1 ml SOC- Medium wurde hinzugefügt und die gesamte Suspension in ein Röhrchen überführt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C oder 28°C für 1 h. Nach einer Zentrifugation bei 3000 upm (Megafuge 3.0R; Heraeus) für 5 min wurden 800 µl des Überstandes abpipettiert. Das Pellet wurde im restlichen SOC-Medium resuspendiert und auf einer Agarplatte ausplattiert. Die Selektion erfolgte über Antibiotikaresistenzen.

II.12.2. Transduktion

Als Transduktion bezeichnet man die Übertragung von DNA aus einer Donor- in eine Akzeptor-Zelle durch Bakteriophagen [Schlegel 1992]. Es wird allgemein zwischen genereller und spezifischer Transduktion unterschieden [Singer und Berg 1992]. Bei der generellen Transduktion kommt es zur Integration der Phagen-DNA an einer beliebigen Stelle im Bakterienchromosom.

Während dieser Arbeit wurde der Phage P22 HT105/1 *int-201* benutzt, bei dem im Gegensatz zum Wildtyp-P22-Phagen die Bildung lysogener Phagen weitgehend unterbunden ist [Maloy *et al.* 1996]. 3 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit *S. Typhimurium* beimpft und 5-8 h inkubiert. Zu 100 µl Kultur wurde 1 µl P22-Phagenlysate gegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. In dieser Phase der Transduktion erfolgt die Adhärenz der Phagen an die Bakterien. Danach wurde 1 ml LB Medium + EGTA (10 mM) zugegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Das EGTA chelatiert die Ca²⁺-Ionen, welche die Phagen zur Adhärenz an die Bakterienzellen

benötigen. So wird die Wahrscheinlichkeit, daß ein Bakterium von mehreren Phagen infiziert wird, geringer. 200 µl des Transduktionsansatzes werden auf einer Selektiv-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotika und EGTA ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf der Agarplatte wachsen nur die mit dem Antibiotikamarker transduzierten Zellen heran.

II.12.2.1. Herstellung des Phagenlysates

Die Phagen infizieren die Bakterien und vermehren sich. Bei der Lyse von Bakterien werden viele Phagen in ihren Köpfen chromosomale bakterielle DNA einschließen, die dann bei einer weiteren Transduktion, durch homologe Rekombination, in die bakterielle DNA eingebaut werden können. Der Einbau des Phagens läßt sich auf geeigneten Selektionsplatten feststellen.

0,5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit *S. Typhimurium* beimpft und ÜN inkubiert. Dazu wurden am nächsten Tag 0,5 ml P22 HT105/1 *int*-201-Phagenlösung einer Konzentration von $1,25^{11}$ pfu/ml (plaque forming unit) pipettiert und 6-8 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Kultur 10 min bei 7000 upm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zugabe von 2 Tropfen Chloroform (CHCl_3) und starkes Schütteln gewährleistete, dass verbliebende Bakterien abgetötet werden. Das Phagenlysat wurde bei 4°C aufbewahrt.

II.12.2.2. Bestimmung der pfu (plaque forming unit)

Top-Agar wurde aufgeköcht und auf 50°C abgekühlt. 2,5 ml Top-Agar wurde in ein Röhrchen überführt und 50 µl Bakterienkultur wurden zugegeben. Die Suspension wurde nach Mischen auf eine LB-Agarplatte gegossen und 15 min. ausgehärtet. Verdünnungsreihen des Phagenlysates wurden hergestellt und auf den Top-Agar dann jeweils 20 µl von der Phagenlysat-Verdünnungen getropft. Jeder Phage bildet eine Lysezone auf dem Bakterienrasen. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen (10^{-6} bis 10^{-9} , in 0,9 % NaCl) wurde die pfu bestimmt [Maloy *et al.* 1996]; Formel: $\text{pfu/ml} = (\text{Anzahl der Plaques} \times 1000 \mu\text{l}) / (20 \mu\text{l} \times \text{Verdünnung})$. Die Phagenlysate für eine erfolgreiche Transduktion sollen 10^9 bis 10^{11} pfu/ml haben.

II.12.2.3. Test auf lytische Phagen

Lytische Phagen lysieren die Bakterien. Durch die poröse Bakterienzellwand wird der in der EBU-Agarplatte der enthaltene Farbstoff eindringen und die Kolonien erscheinen dunkel [Lewin 1998]. Die Bakterienstämme wurden auf EBU-Agarplatte ausgestrichen und für 24 h bei 37°C inkubiert. Bakterien, die frei von lytischen Phagen sind, blieben weiss und konnten selektiert werden.

II.12.2.4. Test auf lysogene Phagen

Die Anwesenheit des lysogenen Phagen P22 verleiht dem Bakterium Immunität gegen Infektionen durch weitere P22-Phagen [Lewin 1998].

Ein Tropfen des Phagen-Lysats HT5 (lytische Mutante von P22) wurde am Rand einer LB-Platte aufgetragen und quer über die Platte laufen gelassen. Senkrecht dazu wurden Bakterien durch das Phagen-Lysat ausgestrichen. Bakterien, die den lysogenen P22 Phagen enthalten werden von HT5 nicht infiziert und wachsen nach Durchstreichen des HT5 Lysates weiter.

II.12.3. Inaktivierung chromosomaler Gene mittels PCR-Produkten (Methode nach Datsenko und Wanner, 2000)

Die von Datsenko und Wanner beschriebene Methode ermöglicht mit Hilfe des λ Red Rekombinase Systems die knock-out von Genen in einem Schritt. Das λ Red rekombinase System enthält die Gene γ (Gam), β (Bet) und *exo* (Exo), welche durch einen Arabinose induzierten P_{araB} Promotor exprimiert werden können. Gam hemmt die Exonuklease V des Wirtes lineare DNA zu degradieren. Bet und Exo können dann verstärkt die Rekombination fördern [Datsenko und Wanner, 2000].

Für das Primer Design wurden 40 bp des Start Bereiches- (Z1) bzw des Stop Bereiches (Z2) des zu deletierenden Genes (Z) mit je 20 bp (P1, P2) des für die Amplifikation der antibiotikaresistenz-Kassette verwendeten Plasmides verlängert (s. Abb. 11. A.). Die PCR Produkte zeigten je nach verwendetem Plasmid eine Fragmentgröße von 1400 bp, 1600 oder 1100 bp (s. Abb. 11. B.). Die PCR Produkte wurden über Qiagen Kit- PCR Säulen aufgereinigt, dann mit DpnI verdaut und über ein Agarose-Gel gereinigt. Bakterien mit dem Plasmid pKD46, welches das λ Red Rekombinase Systems enthält, wurden in 20 ml SOB Medium mit Ampicillin und mit L-Arabinose (1 mM) bei 28°C bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 inkubiert. Aus dieser Bakterienkultur wurden dann die elektrokompetenten Zellen hergestellt (s. Kap. II.12.3.1.). Die Transformation des PCR-Produktes (1-3 μg) in die Zellen erfolgte durch Elektroporation (s. Kap. II.12.1.2., s. Abb. 11. C.). Die Zellsuspension wurde auf Antibiotikaplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Die Klone wurden im Anschluss mit Hilfe der PCR überprüft. Klone ohne Helferplasmid wurden durch Ausstreichen auf Amp-Agarplatten selektiert. Die Entfernung der Antibiotikaresistenz Kassette wurde mit Hilfe des pCP20 Plasmides erreicht (s. Abb. 11. D.). Das pCP20 Plasmid enthält ein temperatur-abhängige FLP Rekombinase, welche direkt mit dem FRT (FLP recognition target) agiert. FRT flankiert das Antibiotikaresistenz-Gen. Das pCP20-Plasmid wurde in die Klone

transformiert und bei 28°C auf LB + Amp-Platten inkubiert. Einzelne Kolonien wurden ausgesucht und auf LB Agarplatten ausgestrichen, so dass nach Inkubation bei 28°C vereinzelt Kolonien auftraten. Die Agarplatten wurden anschliessend bei 43°C ÜN inkubiert. Bei dieser Temperatur geht das temperatursensitive pCP20-Plasmid verloren. Einzelne Klone wurden schließlich auf einer LB + Amp-, dann auf einer LB + Cm-, und auf einer LB Platte ausgestrichen und bei 37°C ÜN inkubiert. Kein Wachstum auf den Antibiotika Platten zeigt, dass die Kolonien das pCP20 Plasmid und die Antibiotikaresistenz Kasette verloren haben. Die Deletion wurde nochmals über PCR und/oder Sequenzierung überprüft.

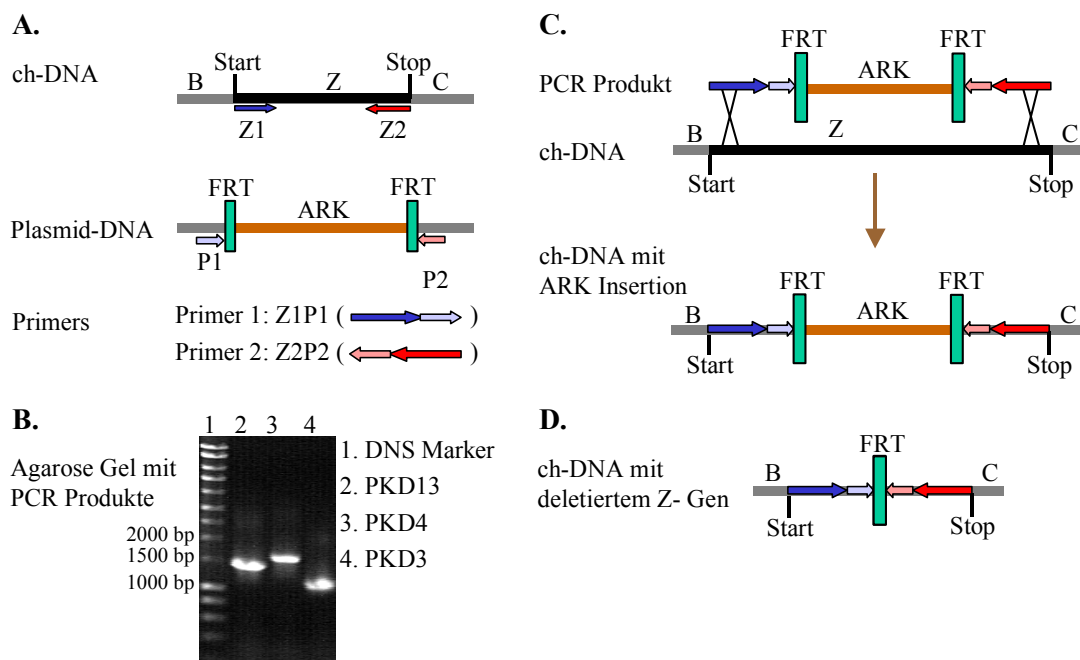


Abb. 11. Schematische Darstellung der Inaktivierung chromosomaler Gene mittels PCR-Produkten: **A.** Primer Desig, **B.** PCR Produkte, **C.** Transformation, **D.** Entfernung der ARK. ch-DNA (chromosomale DNA), FRT (FLP recognition target), ARK (Antibiotikaresistenz-Kassette). Weitere Erklärungen s. Text.

II.12.4. Herstellung einer Inframe-Deletions Mutante (Methode nach Römling, 2001)

Die Inframe-Deletion wurde mit Hilfe des pMAK700 Plasmides erreicht. Das pMAK700 Plasmid enthält ein temperatursensitives Replikon, welches bei 28°C aktiv und bei 42 – 44°C inaktiv ist [Römling 2001].

Ca. 500 bp große DNA-Fragmente aus dem Anfangs- bzw Endbereich des zu modifizierenden Gens sowie der angrenzenden außerhalb des Gens liegenden Bereiche wurden via PCR amplifiziert. Jedes PCR-Fragment wurde zunächst für sich in den

Vektor pBluescript kloniert und in dem *E. coli* Stamm DH5 α transformiert. Anschließend wurden die entsprechenden Vektorkonstrukte wieder aus den Bakterienklonen isoliert und entsprechend verdaut. Die einzelnen Fragmente wurden dann miteinander sowie mit dem Plasmid pMAK700 ligiert. Das pMAK700-Vektorkonstrukt wurde zunächst in den Stamm DH5 α und dann in den Stamm LB5010 transformiert. Nach erneuter Isolierung aus diesem erfolgte die Elektroporation in den Zielstamm. Zunächst wurden 10 ml LB + Cm Medium mit einem Klon des plasmidtragenden Zielstammes angeimpft und ÜN bei 28°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10⁻³-, 10⁻⁴- und 10⁻⁵-Verdünnungen der ÜN-Kultur in LB-Medium hergestellt. Jeweils 200 μ l jeder Verdünnung wurden auf vorgewärmten Agarplatten ausplattiert. Von jeder Verdünnung wurden zwei Agarplatten bei 44°C und eine bei 28°C als Kontrolle für 24 h inkubiert. Waren auf den bei 44°C inkubierten Platten Kolonien zu finden, so war dies ein Zeichen dafür, dass bei diesen Klonen an einem der beiden Enden des zu modifizierenden Gens eine Rekombination mit dem homologen Sequenzabschnitt des Vektorkonstruktes stattgefunden hatte. Hierdurch hatte sich der gesamte Vektor in das Chromosom integriert und die Zelle somit resistent gegen den Cm-Marker gemacht. Zehn dieser Klone wurden noch einmal auf eine LB + Cm Agarplatte ausgestrichen und wiederum bei 44°C ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB + Cm Medium mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 28°C und 150 upm inkubiert (Batch 1; aerophile Bedingungen). Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB + Cm Medium mit 100 μ l von Batch 1 beimpft und für 24 h bei 28°C und 150 upm inkubiert (Batch 2; aerophile Bedingungen). Nach beendeter Inkubation wurde Batch 2 bei 4°C aufbewahrt. 50 ml LB + Cm Medium wurden mit 100 μ l von Batch 2 beimpft und für ca. 6 h unter den genannten Bedingungen inkubiert (Batch 3). Auch Batch 3 wurde nach beendeter Inkubation bei 4°C aufbewahrt. Durch die Inkubation bei 28°C repliziert der Vektor erneut und ist somit im Genom instabil. Durch eine weitere homologe Rekombination wird der Vektor wieder herausgeschnitten. Liegt dieses zweite Rekombinationsereignis am anderen Ende des Gens, so wird somit die Deletion auf das Chromosom gebracht. Sowohl von Batch 2 als auch von Batch 3 wurden 10⁻⁶- und 10⁻⁷-Verdünnungen in LB Medium hergestellt. 100 μ l jeder Verdünnung wurden auf einer LB- Agarplatte ausplattiert und ÜN bei 44°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Replikaplattierung auf eine LB + Cm Agarplatte und auf eine LB-Agarplatte,- es folgte eine Inkubation ÜN bei 44°C. Aus der LB-Agarplatte wurden Cm- resistente Kolonien selektiert, auf einer CR- Agarplatte

ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Einige Klone, die den erwartenden Phänotyp zeigten wurden aufbewahrt und die Inframe-Deletion über PCR überprüft.

II.12.5. Qualitätskontrollen von Plasmiden

II.12.5.1. DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

Der DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen wurde durchgeführt, um den Einbau eines DNA-Fragmentes in einem Plasmid zu überprüfen.

Für einen Verdauansatz wurden folgende Komponenten in einem Reaktionsgefäß zusammenpipettiert: DNA 1 µg; Enzym I (10 U) 1 µl- und falls mit zwei Enzymen verdaut wurde, dann auch noch Enzym II (10 U) 1µl; 10 x Puffer 3 µl; H₂O 30 µl. Der Reaktionsansatz wurde dann 3 h oder ÜN bei 37°C inkubiert.

II.12.5.2. Rousconi-Test

Der Rousconi Test wurde für ein schnelles Screenen einer grossen Anzahl von Klonen auf Insertion eines bestimmten Genes im Plasmid angewendet.

Einzelkolonien wurden jeweils in 12 µl Rousconi-Mix resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 8 µl 1:1 Phenol/Chloroform wurden die Proben geschüttelt und für 2 min bei 13.000 upm zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde direkt auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese konnten anhand des Laufverhaltens der Plasmide Ausgangsvektor und Vektorkonstrukt unterschieden werden.

III. Ergebnisse

III.1. Cellulose Nachweis in *S. Typhimurium*

III.1.1. Nachweis des *bcsABZC*-Operons

In meiner Diplomarbeit hatte ich nach Transposonmutanten gesucht, die den rdar-Morphotyp ändern. Dazu wurde der *S. Typhimurium* Stamm MAE52 benutzt, der rdar-Expression bei 28°C und 37°C zeigt. Das Ergebnis der Transposonmutagenese waren acht unabhängige Mutanten, die einen sogenannten bdar Morphotyp zeigten, bei dem die extrazelluläre Matrixkomponente Curli-Fimbrien exprimiert wurde, jedoch nicht die bislang unbekannte zweite extrazelluläre Matrixkomponente. Der Insertionspunkt des Phages MudJ (s. Abb. 25.) war in den acht Mutanten in der Diplomarbeit durch Sequenzierung bestimmt worden. Daher war bekannt, dass MudJ je viermal in den benachbarten Genen *yhjO* und *yhjL* inseriert war.

Gemäß der *S. Typhimurium* LT2- Sequenz könnten *yhjO* und *yhjL* zusammen mit den Genen *yhjM* und *yhjN* ein Operon bilden. Um mögliche Informationen über die Funktion dieser Genprodukte zu erhalten, wurden die Proteine YhjO, YhjM, YhjN und YhjL mit veröffentlichten Proteinsequenzen verschiedener Bakterienarten verglichen. Dabei wurde eine hohe Homologie zu den an der Cellulose Biosynthese beteiligten Proteinen bei *Gluconacetobacter xylinus*, *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* festgestellt (s. Tab. 7.) [Kawagoe und Demler 1997, Ausmees *et al.* 1999].

Tab. 7. Die Homologie der Proteine YhjO, YhjM, YhjN und YhjL von *S. Typhimurium* LT2 zu den in der Cellulose Biosynthese beteiligten Proteine bei *G. xylinus*, *A. tumefaciens* und *R. leguminosarum*.

	Identität/Ähnlichkeit in %		
	<i>G. xylinus</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>R. leguminosarum</i>
BcsA	36/53	26/44	24/41
BcsB	24/43	14/27	15/29
BcsZ	24/40	14/27	23/38
BcsC	18/32	12/24	-

Aufgrund dieser Analyse konnte von der Hypothese ausgegangen werden, dass *S. Typhimurium* in der Lage sein könnte Cellulose oder ein eng verwandetes Polysaccharid zu produzieren. Um dies experimentell zu beweisen wurde auf

chemischen, mikrobiologischen und anderen Ebenen die Identität der zweiten extrazellulären Matrixkomponente aufgeklärt. Dazu wurden GC/MS- (s. Kap. III.1.8), Elektronenmikroskopie- (s. Kap. III.1.13.) und weitere Verfahren (s. Kap. III.1.7. und III.1.11) verwendet. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten zeigten, dass *S. Typhimurium* Cellulose bildet und dass die Gene *yhjO*, *yhjM*, *yhjN* und *yhjL* direkt an der Cellulose Biosynthese beteiligt sind. Daher wurden diese Gene in *bcsA*, *bcsB*, *bcsZ* und *bcsC* (**b**acterial **c**ellulose **s**ynthesis) umbenannt.

III.1.2. Beteiligung von *bcsA* an der Expression des bdar Morphotyps

Vier MudJ-Insertionen waren in *bcsA* identifiziert worden, während vier andere MudJ-Insertionen in *bcsC* zu finden waren. Das *bcsA* liegt vermutlich in einem Operon mit den Genen *bcsB*, *bcsZ* und *bcsC*, daher war nicht auszuschließen, dass nur die stromabwärts gelegene Gene, nicht jedoch *bcsA*, an dem bdar Morphotyp beteiligt sind. Um somit auszuschließen, dass der bdar Morphotyp durch einen polaren Effekt auf stromabwärts gelegene Gene entstanden ist, wurde eine Gendeletion im Leserahmen des *bcsA* Gens hergestellt.

Für die Herstellung der Gendeletion wurde das Plasmid pMAK700 und die Primerpaare *yhjO5*/*yhjO6* und *yhjO7*/*yhjO8* nach dem in Kapitel II.12.4. beschriebenen Prinzip verwendet. Das daraus resultierende Plasmid, pXZO1 wurde anschließend in den *S. Typhimurium* MAE52 (rdar Morphotyp) elektroporiert. Durch homologe Rekombinationsereignisse wurde auf dem Chromosom das intakte *bcsA*-Gen durch das um 2055 bp deletierte, nicht funktionsfähige *bcsA* des Plasmids pXZO1 ausgetauscht (s. Abb. 12.).

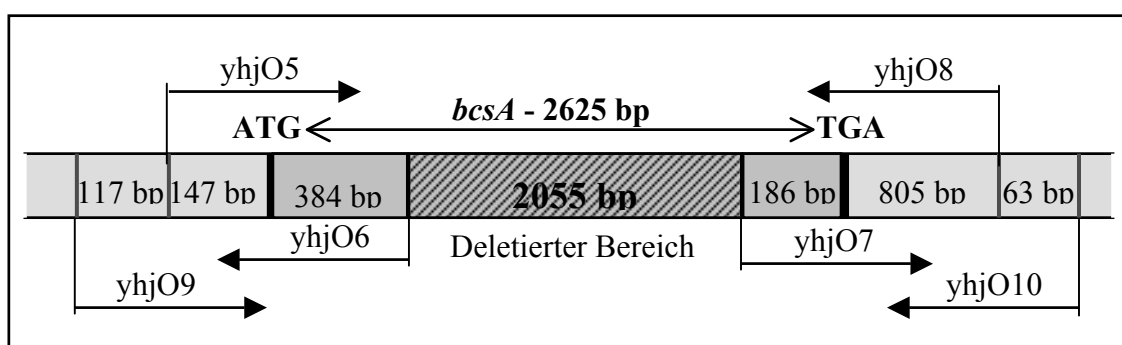


Abb. 12. Schematische Darstellung der *bcsA*-Deletion in *S. Typhimurium* Stamm MAE52. Der grau gestreifte Balken zeigt den deletierten Bereich. Die grauen Balken zeigen die im Chromosom im Leserahmen zurückgebliebenen *bcsA*-Bereiche. Die hell grauen Balken zeigen die DNA-Bereiche ausserhalb des *bcsA*-Genes. Die Pfeile markieren die Lage und Orientierung der verwendeten Primer.

Die neue *bcsA*-Deletionsmutante wurde MAE171 benannt. Die Gendeletion wurde durch PCR mit Hilfe der Primer *yhjO9*/*yhjO10* überprüft. Anschließend wurde der

Morphotyp von MAE171 auf CR-Agarplatten getestet und mit dem des Stammes MAE150 (MAE52 *bcsA*::MudJ) verglichen. Beide Stämme exprimierten den bdar Morphotyp. Dies zeigt, dass alleine das Fehlen des *bcsA*-Gens für das Auftreten des bdar Morphotypes ausreichend ist.

III.1.3. Transkriptionsaktivität der *bcsA*- und *bcsC*- Gene

Der rdar Morphotyp ist abhängig von der Wachstumsphase und wird nur unter bestimmten Umweltbedingungen exprimiert. So wird der rdar Morphotyp in der stationären Phase, nicht aber in der logarithmischen Phase exprimiert [Römling *et al.* 1998a, Gerstel *et al.* 2001]. Die Expression des rdar- Morphotypes unterbleibt bei hoher Osmolarität (0,5 M NaCl) oder bei Zugabe von Glukose (0,4 %) zum LB (ohne Salz) Medium [Römling *et al.* 1998a, Gerstel 2004]. Mit Hilfe des Transposons MudJ wurden die Transkriptionsraten der *bcsA*- und *bcsC*- Gene durch β -Galaktosidase Messungen in den entsprechenden Transposonmutanten MAE150 (MAE52 *bcsA*::MudJ) und MAE155 (MAE52 *bcsC*::MudJ) sowohl im Wachstumsverlauf als auch unter verschiedenen Umweltbedingungen bestimmt.

Zuerst wurde die Abhängigkeit der Transkriptionsaktivität von *bcsA* und *bcsC* von der Wachstumsphase untersucht. Hierfür wurden die Kulturen in LB (ohne Salz) Medium bei 28°C unter aerophilen Bedingungen gezogen (s. Kap. II.8.1.2.). β -Galaktosidase Aktivitäten von *bcsA* und *bcsC* waren schon während der exponentiellen Wachstumsphase signifikant vorhanden und stiegen bei Erreichen der stationären Phase auf das 3-4 fache an. Die Transkriptionsaktivität des *bcsC* Genes war in der stationären Phase 1,5 fach höher als die des *bcsA* Genes (s. Abb. 13. A.).

Ebenso wie der rdar Morphotyp war auch die Expression des *bcsA*- und *bcsC*-Genes am stärksten in der stationären Phase. Aber im Gegensatz zum rdar Morphotyp, fand eine Expression der *bcs*-Gene schon während der exponentiellen Wachstumsphase statt.

Die Aktivität von *bcsA* in der stationären Phase wurde zusätzlich auch unter verschiedenen Umweltbedingungen getestet, um die Korrelation der Expression zwischen *bcsA* und dem rdar Morphotyp zu untersuchen. Hierfür wurde *S. Typhimurium* MAE150 bei 37°C für 24 h inkubiert. Während keine signifikanten Unterschiede der β -Galaktosidase Aktivität unter mikroaerophilen-, anaeroben- und Eisenmangel- Bedingungen sowie im Minimalmedium gemessen wurden, fiel die Aktivität dennoch um 1/3 verglichen mit der Expression gemessen von einer LB (ohne Salz) Agarplatte. Zugabe von 0,5 M NaCl oder 0,4 % Glukose reduzierte die β -

Galaktosidase Aktivität um 57 % bzw. 63 % ebenfalls verglichen mit der Aktivität gemessen von einer LB (ohne Salz) Agarplatte (s. Abb. 13. B.).

Diese Ergebnisse zeigen, dass es eine Abhängigkeit der Transkription von *bcsA* von Umweltbedingungen gilt, aber, dass die Expression von *bcsA* nicht mit der Expression des *rdar* Morphotypes korreliert.

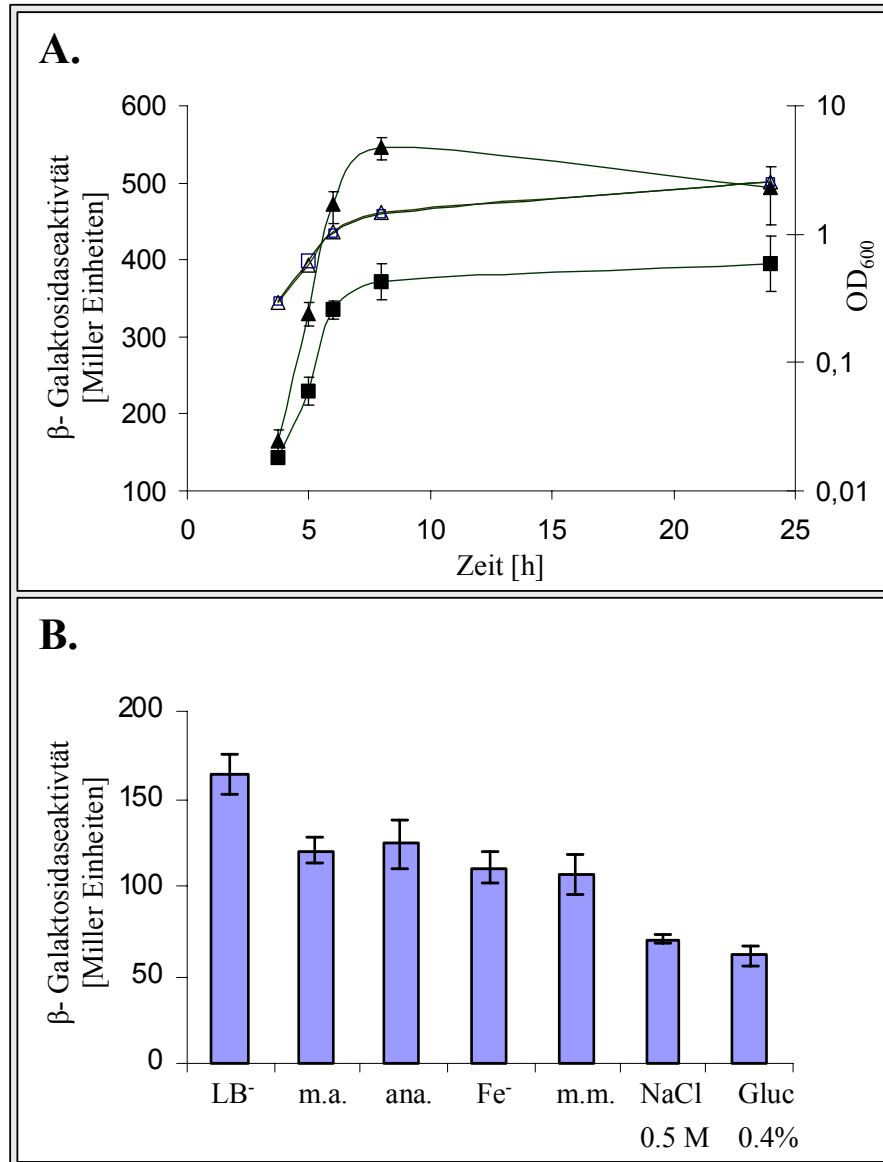


Abb. 13. β-Galaktosidaseaktivität der *bcs*-Gene unter verschiedenen Bedingungen. **A).** Transkription der *bcs*-Gene in Abhängigkeit von der Wachstumsphase. Die Offenen Symbole zeigen die Wachstumsphase (OD₆₀₀); die geschlossenen Symbole die β-Galaktosidaseaktivität. Quadrate symbolisieren den Stamm MAE150 (MAE52 *bcsA*::MudJ), Dreiecke den Stamm MAE155 (MAE52 *bcsC*::MudJ). **B).** Expression des *bcsA*-Genes unter verschiedenen Umweltbedingungen. LB⁻ (LB ohne Salz, Platte); m.a. (mikroaerophile Kultur); ana. (Anaerob, LB- (ohne Salz) Platte); Fe⁻ (Eisenmangel, Platte); m.m. (Minimalmedium, Platte); 0,5 M NaCl. (ohne Salz) Platte); 0,4 % Gluc. (Glukose, Platte).

III.1.4. Transkriptionelle Abhängigkeit der Gene *bcsA* und *bcsC* von den Regulatoren CsgD und RpoS

CsgD ist ein Regulatorgen für die Ausbildung des rdar Morphotyps. CsgD reguliert auf transkriptioneller Ebene die Curli-Fimbrien Gene *csgBA* und auch das *adrA* Gen, welches an der Regulation der Biosynthese der zweiten unbekannten extrazellulären Substanz beteiligt ist [Römling *et al.* 1998a/2000]. Während *RpoS* (σ^S -Untereinheit der RNA-Polymerase) den pdar Morphotyp und das *adrA* Gen reguliert [Römling *et al.* 1998a/2000]. Inwieweit die Transkription der Gene *bcsA* und *bcsC* von den Regulatoren CsgD und RpoS beeinflusst wird wurde über transkriptionelle Funktionen von *bcsA* und *bcsC* zur β -Galaktosidase in den *csgD*- oder *rpoS*- Mutanten getestet. Dazu wurden die entsprechenden Mutanten auf Agarplatten für 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Es wurde kein signifikanter Einfluß von CsgD oder RpoS auf die Transkription des *bcsA*- bzw. *bcsC*-Gene festgestellt (s. Abb. 14.). CsgD und RpoS regulieren die Biosynthese der unbekannten Substanz somit über *AdrA* und nicht auf transkriptioneller Ebene über die *bcsA*- und *bcsC*- Gene.

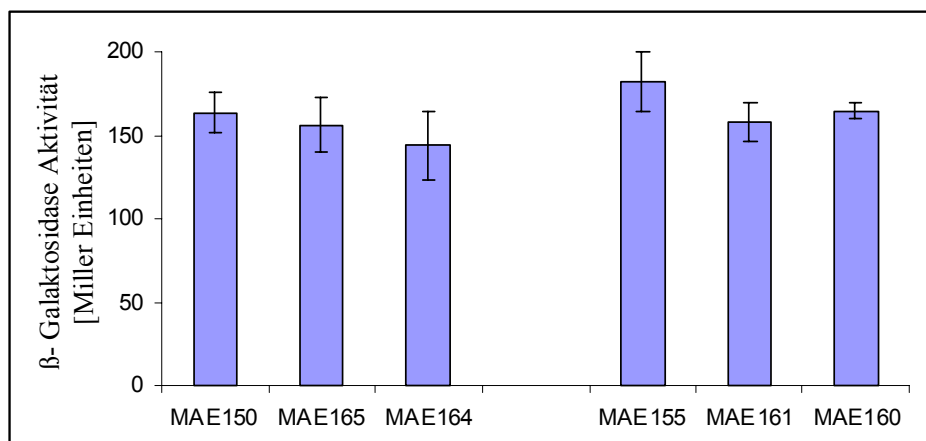


Abb. 14. β -Galaktosidaseaktivitäten der *bcsA*::MudJ- und *bcsC*::MudJ-Fusionen in $\Delta csgD$ und $\Delta rpoS$. MAE150 (MAE52 *bcsA*::MudJ), MAE165 (MAE51 $\Delta csgD$, *bcsA*::MudJ), MAE164 (MAE42 $\Delta rpoS$, *bcsA*::MudJ); MAE155 (MAE52 *bcsC*::MudJ), MAE161 (MAE51 $\Delta csgD$, *bcsC*::MudJ), MAE160 (MAE42 *rpoS*, *bcsC*::MudJ).

III.1.5. Transkriptionelle Abhängigkeit des *adrA*-Genes von BcsA

AdrA wird durch CsgD transkriptionell reguliert und aktiviert somit die Biosynthese der zweiten unbekannten extrazellulären Substanz [Römling *et al.* 2000]. Es könnte somit eine Rückkopplung bestehen, wobei die Produktion der unbekannten Substanz die Expression von *adrA* beeinflussen könnte. Hierzu wurde die Transkriptionsrate einer *adrA*::MudJ-Fusion im Wildtyp (ADR1A) und in einer *bcsA*-Mutante (MAE174) gemessen und verglichen. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Aktivität der

β -Galaktosidase zwischen den beiden Stämmen festgestellt (s. Abb. 15.). Dies zeigt, dass die Expression des *adrA*-Genes nicht von der Biosynthese der unbekannten Substanz beeinflusst wird.

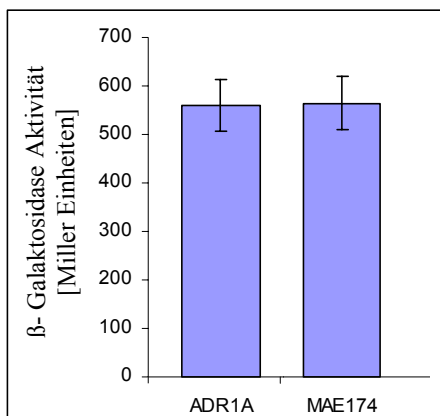


Abb. 15. β -Galaktosidaseaktivität des *adrA* Genes. Die Transkription des *adrA*-Genes ist Unabhängig von BcsA und somit von der Biosynthese der unbekannten extrazellulären Substanz. ADR1A (*adrA::MudJ*), MAE174 ($\Delta bcsA$, *adrA::MudJ*).

III.1.6. Test des Morphotypes einer Doppelmutante

Die Mutanten MAE150 (MAE52 *bcsA::MudJ*) und MAE155 (MAE52 *bcsC::MudJ*) zeigen den bdar Morphotyp (Curli-Fimbrien produzierend). Die Curli-Fimbrien Mutante MAE97 (MAE52 $\Delta csgBA$) zeigt den pdar Morphotyp (Produktion einer unbekannten extrazellulären Substanz). Der Ausgangsstamm dieser Mutanten, MAE52 exprimiert beide diese extrazellulären Matrixkomponente und damit den rdar Morphotyp.

Wie verhält sich eine Mutante, die weder Curli-Fimbrien noch die unbekannte Substanz produziert? Um diese Frage zu beantworten wurde der Stamm MAE97 mit dem Phagenlysat von MAE150 oder mit dem Phagenlysat von MAE155 transduziert (II.12.2.). Die resultierenden Mutanten MAE190 (MAE150 *bcsA::MudJ*; $\Delta csgBA$) und MAE192 (MAE155 *bcsC::MudJ*; $\Delta csgBA$) wurden dann auf ihre Morphotypexpression auf CR-Agarplatten getestet. Beide Mutanten zeigten den saw Morphotyp, welcher kein multizelluläres Verhalten zeigt.

Damit konnte gezeigt werden, dass Curli-Fimbrien und die unbekannte Substanz die einzigen Komponenten der extrazellulären Matrix sind, die an der Bildung des rdar Morphotypes auf CR-Agarplatten beteiligt sind. Da die unbekannte Substanz bei den *bcsA*- und *bcsC*-Mutanten nicht exprimiert wurde, und deren homologen Gene von *G. xylinus*, *A. tumefaciens* und *R. leguminosarum* (s. Kap. III.1.1.) für die Cellulose Biosynthese kodieren, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es auch *S. Typhimurium* in der Lage sein könnte Cellulose zu synthetisieren und es sich bei der unbekannten extrazellulären Substanz um Cellulose handeln könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden gezielt Experimente zur Identifizierung einer Cellulose Biosynthese in *S. Typhimurium* durchgeführt.

III.1.7. Stabilität der Bakterienaggregate gegenüber Cellulase- oder Proteinase K-Verdau

In vorangegangenen Experimenten wurde festgestellt, dass die Bakterienaggregate von *rdar*-, *pdar*- und *bdar*- Morphotypen unterschiedliche Konsistenzen zeigen (s. Kap. I.1.2.). Während die Bakterienaggregate des *rdar* Morphotypes und des *pdar* Morphotypes nur schwer gelöst werden können, sind die Bakterienaggregate des *bdar* Morphotypes einfacher zu resuspendieren. Die extrazelluläre Matrix des *bdar* Morphotypes besteht nur aus proteinösen Curli-Fimbrien. Hier ist die Expression der zweiten Matrixkomponente durch die *bcsA* Gendeletion ausgeschaltet. Bei dem *pdar* Morphotyp ist das Gegenteil der Fall. Dieser Morphotyp exprimiert die unbekannte Matrixkomponente aber nicht die Curli-Fimbrien. Der *rdar* Morphotyp exprimiert beide extrazellulären Matrixkomponenten.

Um Hinweise über die Eigenschaften der unbekannten extrazellulären Matrixkomponente zu erhalten, wurden die Bakterienaggregate aller drei Morphotypen mit Cellulase und Proteinase K verdaut (s. Kap. II.8.7.3. bzw. Kap. II.8.7.4.). Durch Behandlung der *rdar*-Bakterienaggregate mit diesen Enzymen konnte zusätzlich die Funktion einer Kopplung der unbekannten Substanz und Curli-Fimbrien an der Stabilität der Bakterienaggregate getestet werden. Dazu wurden die Bakterienaggregate des *rdar* Morphotypes mit Cellulase oder Proteinase K verdaut.

Die *rdar*-Bakterienaggregate blieben auch nach 72 h Inkubation mit Cellulase oder Proteinase K unverändert. Durch die Co-Expression der unbekannten extrazellulären Substanz und Curli-Fimbrien bilden die Bakterienaggregate des *rdar* Morphotypes eine für Proteinase K oder Cellulase unverdauliche extrazelluläre Matrix.

Bei Verdau des *bdar* Morphotypes mit Cellulase konnten auch nach 72 h Inkubation unter dem Mikroskop noch kleine Bakterienaggregate beobachtet werden. Dagegen löste die Proteinase K die *bdar*-Bakterienaggregate, die aus den proteinösen Curli-Fimbrien bestehen, schon nach 2 h komplett auf.

Die Bakterienaggregate des *pdar* Morphotypes wurden bei Verdau mit Cellulase schon nach 2 h vollständig aufgelöst, während ein Verdau mit Proteinase K auch nach 72 h Inkubation die *pdar*-Bakterienaggregate nicht auflöste.

Aus diesem Ergebniss geht deutlich hervor, dass die unbekannte extrazelluläre Matrixkomponente eine Substanz ist, die mit Cellulase verdaut werden kann. Das Enzym Cellulase spaltet die 1-4- β -glykosidischen Bindungen aus denen das Polysaccharid Cellulose besteht. Somit unterstützt dieses Ergebnis die Annahme, dass es sich bei der unbekannten extrazellulären Substanz um Cellulose handelt.

III.1.8. Glukose Nachweis durch GC/MS

Cellulose besteht aus Glukose Molekülen, die in linearen Ketten durch β -1-4-glycosidische Bindungen verknüpft sind. Durch Detektion der Glukose im GC/MS könnte die Bildung von Cellulose bei verschiedenen Bakterienstämmen nachgewiesen werden. Die Bakterien wurden nach Inkubation bei 37°C für 24 h bzw. bei 28°C für 48 h auf LB (ohne Salz) Agarplatten geerntet und für die GC/MS nach der Updegraff-Methode aufbereitet (s. Kap. II.9.1.) [Updegraff, 1969]. Die Updegraff-Methode basiert auf dem Prinzip, dass durch die Behandlung der Proben mit heißen Säuren nur kristalline Cellulose als einziges Kohlenhydrat stabil bleibt. Bei allen *S. Typhimurium* ATCC14028 Derivaten, die den rdar- oder pdar- Morphotyp exprimierten, konnte Glukose über GC/MS detektiert werden (s. Abb. 16. A.), während bei den Stämmen mit bdar- oder saw- Morphotyp keine oder nur sehr geringe Mengen an Glukose nachgewiesen wurde (s. Abb. 16. B.).

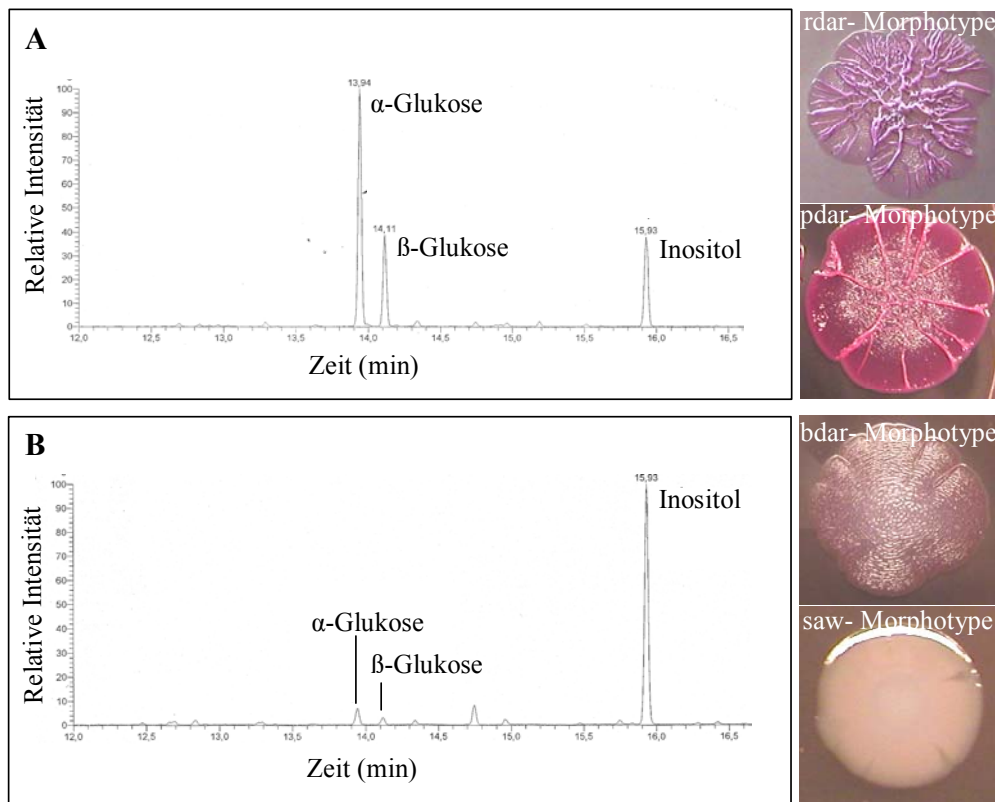


Abb. 16. Glukose-Detektion durch GC/MS. Im GC/MS-Chromatogramm zeigt Glukose zwei charakteristische Peaks: die α -Form und die β -Form [Chaplin und Kennedy, 1996],- hier bei 13,94 min bzw. bei 14,11 min **A).** MAE97 (pdar- Morphotyp). **B).** MAE51 (saw- Morphotyp). Weitere Erklärungen s. Text.

Für eine Abschätzung der Glukosemenge wurde Inositol als Standard und der Wert der α -Form von Glukose als Referenz verwendet. Cellulose Produktion wurde auch in dem *S. Typhimurium* Stamm SR11b [Römling *et al.* 1998b], *S. enteritidis* Stamm 27655-3b

[Collinson *et al.* 1991] und *S. enteritidis* Stamm 728-b [Bokranz 2003] nachgewiesen. Alle drei Stämmen exprimieren den rdar Morphotyp.

Um die β -1,4-Bindungen im untersuchten Zucker zu bestätigen wurden die Glukosepolymere acetyliert und methyliert [Anamula und Taylor 1992]. Nach dieser Behandlung wurde aus den Proben ausschließlich 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylglucitol, ein charakteristisches Derivat für β -1,4-glycosidischen Bindungen, detektiert.

Durch die GC/MS Analyse wurde somit nachgewiesen, dass die zweite unbekannte extrazelluläre Substanz des rdar Morphotypes Cellulose ist. Im Folgenden wird in dieser Arbeit nicht mehr von der „unbekannten Substanz“ gesprochen, sondern von Cellulose.

III.1.9. Herstellung und Untersuchung von Glykogen Mutanten

Die Herstellung von Glykogen Mutanten und deren Analyse sollte dazu dienen, um die Möglichkeit auszuschliessen, dass die Glukose Werte bei der GC/MS Messungen aus degradiertem Glykogen stammen könnten. Darüber hinaus sollte nachgeprüft werden, ob Glykogen einen Einfluss auf die Expression des entsprechenden Morphotypes hat. Glykogen besteht aus α -1,4- und α -1,6-glycosidische Bindungen und wird von vielen Bakterien als Speicherkohlenhydrat genutzt. Mit Hilfe der Lugolschen-Lösung auf Kornberg-Agarplatten kann die Präsenz von Glykogen in den Bakterien nachgewiesen werden. Die Lugolsche-Lösung besteht aus I_2 und KI. Das I_2 ist in der Lage sich in die Helixstruktur des Glykogens einzulagern und somit einen gefärbten Iod-Glykogen-Komplex zu bilden. Bakterien, die Glykogen haben, erscheinen nach Behandlung mit Lugolscher-Lösung dunkel [Govonos *et al.* 1969, Romeo *et al.* 1988].

Eine knock-out Glykogenmutante (Erhalten von Dr. Öjar Melefors - Karolinska Institute, Stockholm) wurde in die *S. Typhimurium* Stämme MAE52 (rdar), MAE97 (pdar) und MAE51 (saw) transduziert. Zur Überprüfung der Transduktion wurden die resultierenden Mutanten MAE196 (MAE52 *glgAC*::MudJ), MAE198 (MAE97 *glgAC*::MudJ) und MAE218 (MAE51 *glgAC*::MudJ) auf Kornberg-Agarplatten ausgestrichen und mit Lugolscher-Lösung, wie im Kap. II.8.9. beschrieben, behandelt. Alle drei Mutanten blieben hell. Abb. 17. A. stellt ein Beispiel einer mit Lugolscher-Lösung behandelte Kornberg-Agarplatte dar. Die *S. Typhimurium* getesteten Stämme ADR1a, MAE51, MAE52 und UMR1 sind Glykogen positiv. Die Bakterienaggregate der Glykogenmutanten wurden nach der Updegraf-Methode aufbereitet und dann die Probe im GC/MS analysiert. Auch hier wurde Glukose detektiert gleich wie in *S. Typhimurium* MAE97 (s. Abb. 16.). Dies bedeutet, dass die detektierten Glukosemoleküle aus Cellulose und nicht etwa aus Glykogen stammen. Anschließend

wurden die Glykogenmutanten auf CR-Agarplatten ausgestrichen um deren Morphotyp zu analysieren. Alle Glykogen-Mutanten zeigten einen unveränderten Morphotyp zum Ausgangsstamm, was darauf hindeutet, dass Glykogen nicht an der Expression der entsprechenden Morphotypen beteiligt ist. Abb. 17. B. zeigt die Glykogenmutante MAE198 und ihr Ausgangsstamm MAE97 auf einer CR-Agarplatte.

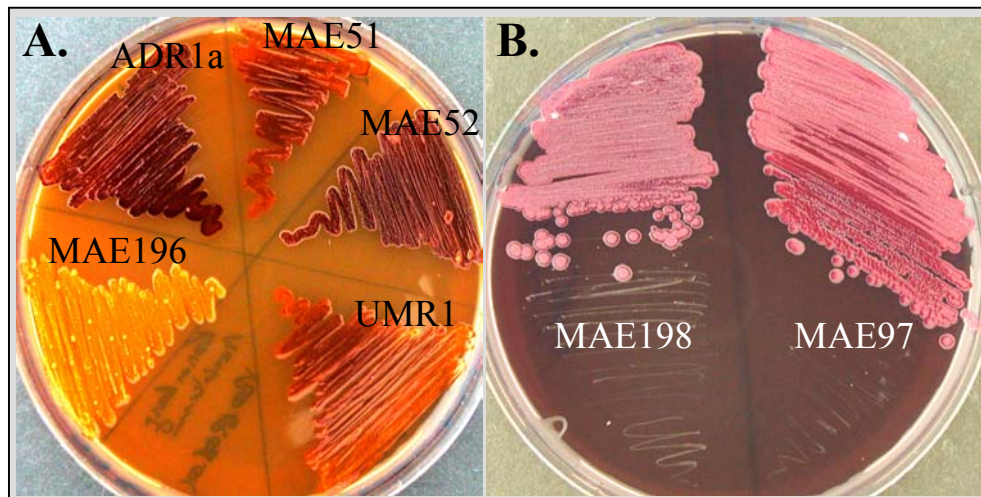


Abb. 17. Glykogen-Mutanten auf Kornberg- und CR-Agarplatten. **A).** Kornberg-Agarplatte nach Inkubation bei 37°C für 24 h behandelt mit Lugolsche-Lösung; MAE196 (*glgAC::MudJ*), ADR1a (*adrA::MudJ*), MAE51 ($\Delta csgD$), MAE52 (Wt), UMR1 (Wt). **B).** CR-Agarplatte; Inkubation 24 h bei 37°C. MAE198 (MAE97 *glgAC::MudJ*) und MAE97 ($\Delta csgBA$). Weitere Erklärungen s. Text.

III.1.10. Messung der Hydrophobizität der extrazellulären Matrix

Die verschiedenen Morphotypen exprimieren proteinöse und/oder zuckerhaltige extrazelluläre Matrixkomponente, welche die Hydrophobizität der Bakterienoberfläche beeinträchtigen. Die Hydrophobizität der extrazellulären Matrix wurde bestimmt, indem der Kontaktwinkel eines Wassertropfens auf einem mit Bakterien bewachsenem Filter bestimmt wurde (s. Kap. II.8.8.) [Mills und Powelson, 1996]. Höheren Kontaktwinkel sind ein Hinweis auf erhöhte Hydrophobizität.

Der *S. Typhimurium* Stamm MAE52, der beide Komponenten (Cellulose und Curli-Fimbrien) des *rdar* Morphotypes exprimiert, wies den höchsten Kontaktwinkel auf (76,95°). Der geringste Kontaktwinkel wurde bei MAE51 gemessen (21°). Dieser Stamm produziert weder Cellulose noch Curli-Fimbrien (*saw* Morphotyp). Für den Cellulose positiven aber Curli-Fimbrien negativen Stamm MAE97 (*pdar* Morphotyp) wurde ein Kontaktwinkel von 26,51° gemessen, während der Cellulose negative aber Curli-Fimbrien positive Stamm MAE150 (*bdar* Morphotyp) ein Kontaktwinkel von 51,41° aufwies (s. Abb. 18.). Da der Kontaktwinkel gemessen bei MAE52 am höchsten

war, deutet dies darauf hin, dass die Co-Expression von Cellulose und Curli-Fimbrien die Hydrophobizität der Bakterienoberfläche erhöht.

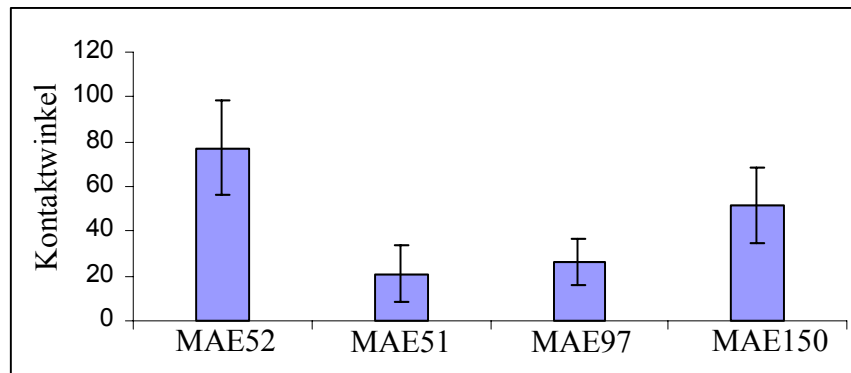


Abb. 18. Kontaktwinkel der *S. Typhimurium* Stämme. MAE52; MAE51 (MAE52 $\Delta csgD$); MAE97 (MAE52 $\Delta csgBA$) und MAE150 (MAE52 *bcsA::MudJ*). Weitere Erklärungen s. Text.

III.1.11. Nachweis von Cellulose mit Hilfe von CF-Färbungen

Vorangegangenen Untersuchungen hatten gezeigt, dass die *S. Typhimurium* Stämme, die Cellulose oder Curli-Fimbrien oder beide Matrixkomponenten ausbilden, die Fähigkeit haben den Farbstoff Kongorot (CR) zu absorbieren und auf CR-Agarplatten den rdar-, pdar- oder bdar- Morphotyp zu zeigen [Römling *et al.* 1998a, Römling und Rohde 1999]. Auf CR-Agarplatten zeigte die *bcsA*-Mutante MAE171 (MAE52 $\Delta bcsA$) den bdar Morphotyp. Die drei CR-bindenden Morphotypen und der als Negativkontrolle saw Morphotyp wurden auf Calcoflour-Bindung getestet. Calcoflour (CF) bindet an 1-4 und 1-3 β -Glukane und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 366$ nm. Dadurch kann die Präsenz der Cellulose in den zu testenden Stämmen nachgewiesen werden.

Abb. 19. a. (CR) zeigt die drei CR-bindenden Morphotypen rdar (A), pdar (B), bdar (C) sowie den saw Morphotyp (D). Während der rdar- und pdar-Morphotyp aufgrund der Bindung des CF an die Cellulose fluoreszierten (s. Abb. 19. a. CF; A. und B.), zeigten die Morphotypen bdar und saw keine Fluoreszenz (s. Abb. 19. a. CF; C. und D.).

Unter dem Mikroskop sollte außer dem Cellulosefibrillen-Nachweis auch noch eine mögliche Kopplung der Cellulose mit den Curli-Fimbrien untersucht werden. Dazu wurde der Stamm MAE52, der Cellulose und Curli-Fimbrien produziert (rdar Morphotyp) und MAE97, der nur Cellulose bildet (pdar Morphotyp) benutzt. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Bakterien von einer LB (ohne Salz) Agarplatte entnommen und in (0,025 % filtrierter) Calcoflour-Lösung soweit wie möglich resuspendiert. Mit Hilfe der Fluoreszenz Mikroskopie (FI) konnten bei MAE97

die Cellulose Fibrillen nachgewiesen werden (s. Abb. 19. b. Fl MAE97). Im Stamm MAE52 konnten die Cellulose Fibrillen nicht gesehen werden. Hier konnte eine stark fluoreszierende “Flocke” beobachtet werden, die aufgrund der Interaktion der Curli-Fimbrien mit Cellulose entsteht (s. Abb. 19. b. Fl. MAE52). Im Phasenkontrast (Ph) wurde beobachtet, dass im Falle des *rdar* Morphotypes die Bakterienaggregate stärker ausgeprägt sind als die des *pdar* Morphotypes (s. Abb. 19. b. Ph.).

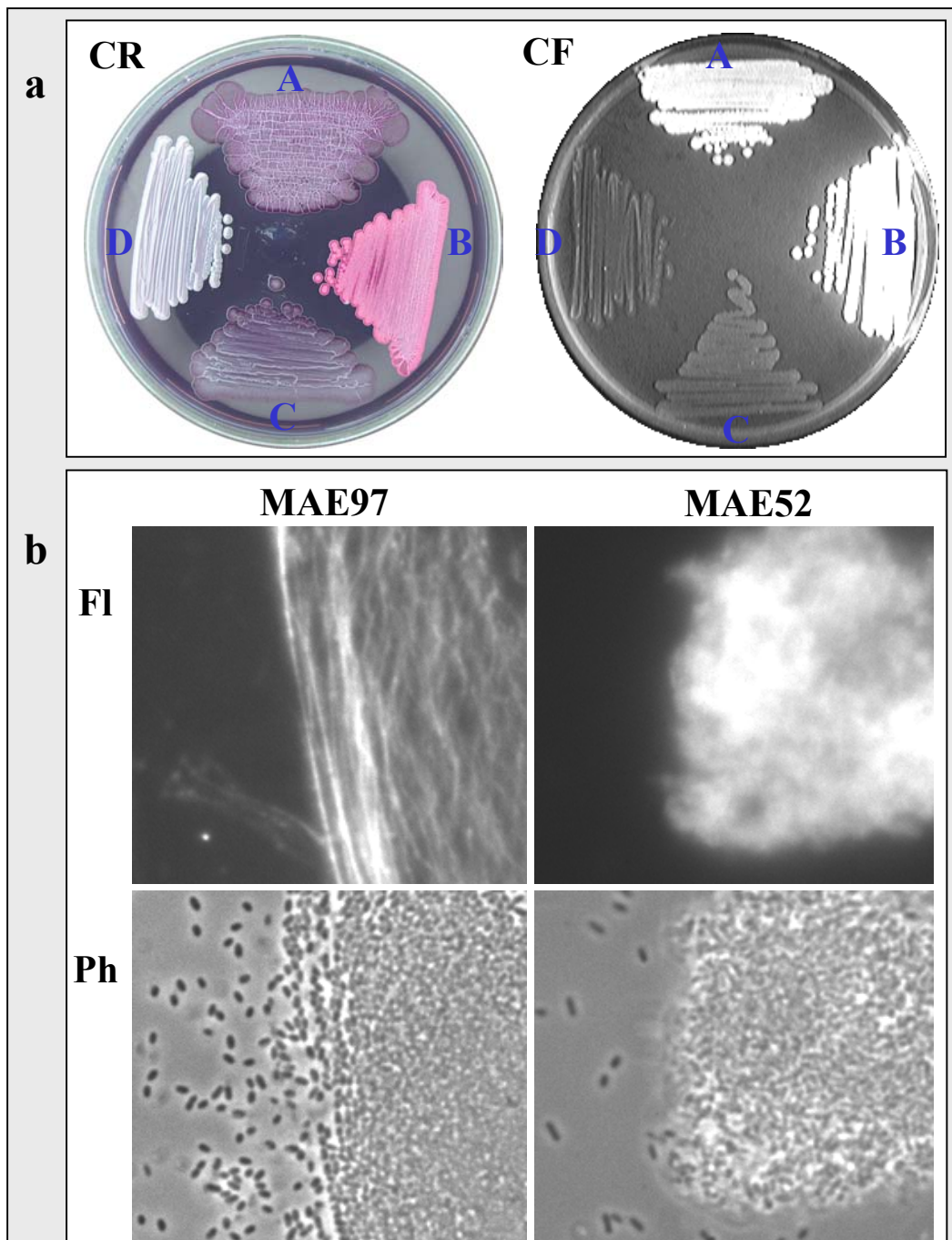


Abb. 19. Nachweis der Cellulose mit Hilfe von CF-Färbungen. **a).** Bakterienstämme auf CR- und CF-Agarplatten; Inkubation 24 h bei 37°C. A: MAE52 (*rdar*), B: MAE97 (MAE52 $\Delta csgBA$, *pdar*) C: MAE171 (MAE52 $\Delta bcsA$, *bdar*) und D: MAE190 (MAE52 $\Delta bcsA$, $\Delta csgBA$, *saw*). **b).** Mikroskopische Nachweis der Cellulose durch CF-Färbung. Fl: (Fluoreszenz), Ph. (Phasenkontrast). Weitere Erklärungen, s. Text.

III.1.12. Expression der Cellulose in der Minimalmedium-Kultur

Die Transkriptionsaktivität des *rdar*-Regulatorgenes *csgD* wurde unter verschiedenen Umweltbedingungen getestet [Gerstel *et al.* 2001, Gerstel und Römling 2003]. Erhöhte *csgD*-Transkriptionsaktivitäten wurden gemessen, wenn die Bakterienkultur in LB (ohne Salz) Medium unter mikroaerophilen Bedingungen (s. Kap. II.8.1.3) gezüchtet wurde. Das Gegenteil war der Fall, wenn Minimalmedium (MM) für die Kultivierung benutzt wurde. Hier waren die Transkriptionsaktivitäten von *csgD* unter aerophilen Wachstumsbedingungen (s. Kap. II.8.1.2.) höher als unter mikroaerophilen Bedingungen. Überdies korreliert die Bildung der Bakterienaggregate des *rdar* Morphotypes unter verschiedenen Umweltbedingungen mit dem Grad der *csgD*-Expression [Gerstel und Römling 2003].

Ob auch die Expression der Cellulose mit der Bildung von Bakterienaggregaten im MM unter aerophilen Wachstumsbedingungen korreliert, wurde durch Untersuchungen der Bakterienaggregate von MAE97 (MAE52 $\Delta csgBA$, *pdar*) getestet. Der Cellulose produzierende Stamm MAE97 wurde in MM unter aerophilen Bedingungen für 48 h bei 37°C kultiviert. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Bakterienaggregate von der Kultur entnommen und in (0,025 % filtrierter) Calcoflour-Lösung soweit wie möglich resuspendiert. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie konnten bei MAE97 die Cellulose Fibrillen nachgewiesen werden (s. Abb. 20. Fluoreszenz). Damit ist gezeigt, dass *S. Typhimurium* MAE97 im MM Cellulose exprimiert und dies mit der Bildung von Bakterienaggregaten korreliert (s. Abb. 20. Phasenkontrast).

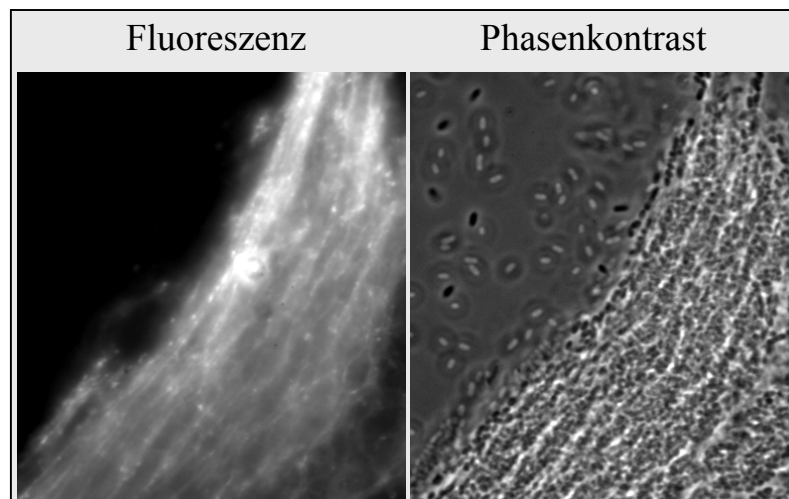


Abb. 20. Mikroskopische Aufnahmen der mit CF gefärbten Cellulose-Fibrillen von *S. Typhimurium* MAE97. Weitere Erklärungen, s. Text.

III.1.13. Elektronenmikroskopische Analyse der Cellulose-Mutanten

In der Elektronenmikroskopie (EM) sollte die Struktur der Bakterienaggregate der Cellulose-Mutanten und der Einfluss der Cellulose an der Bildung des *rdar* Morphotypes untersucht werden. Dazu wurden die Cellulose-negative Mutante MAE150 (MAE52 MudJ::*bcsA*) und die Doppelmutante MAE190 (MAE52 MudJ::*bcsA* Δ *csgBA*) die weder Cellulose noch Curli-Fimbrien produziert, verwendet.

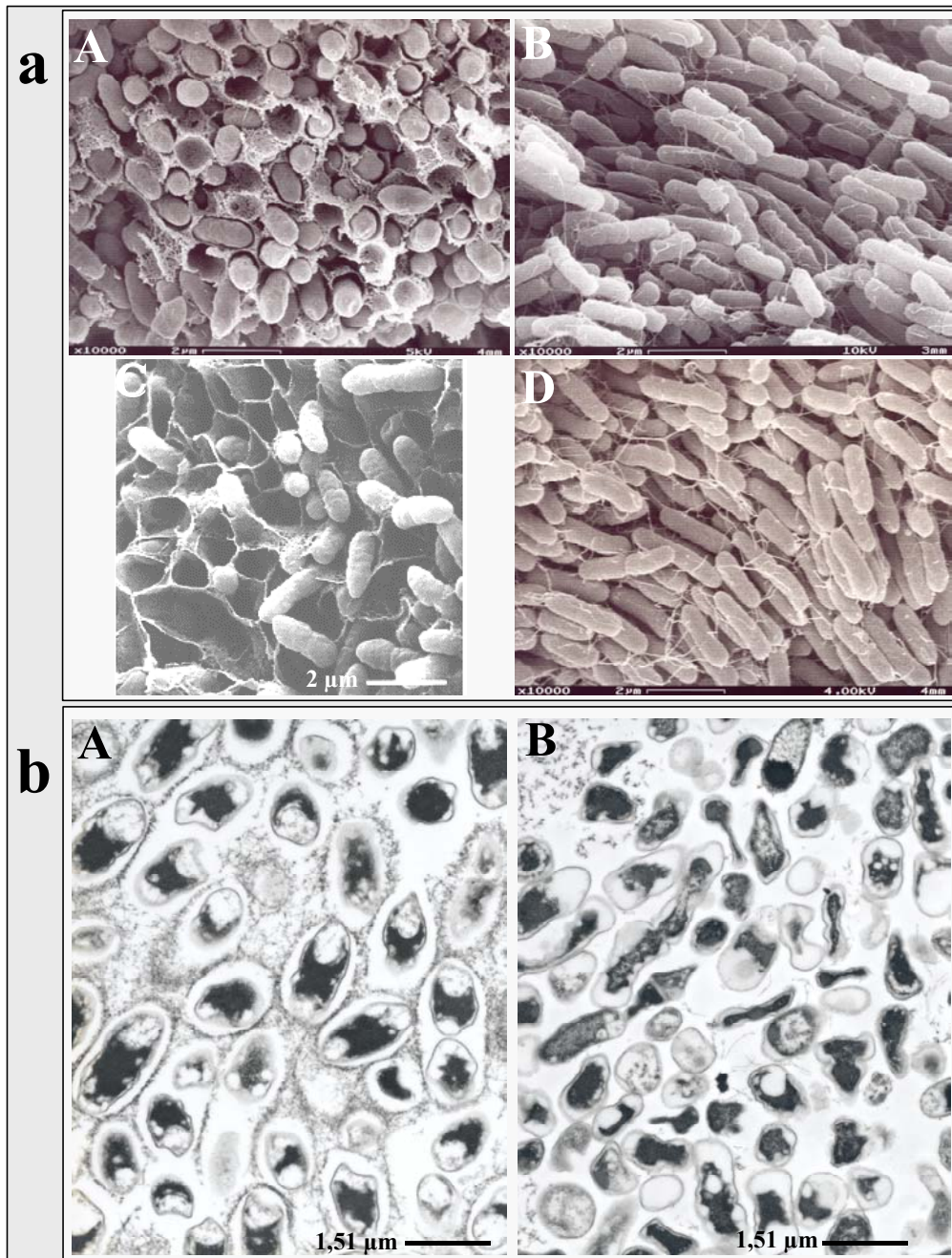


Abb. 21. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *S. Typhimurium* Bakterienaggregaten. **a).** Rasterelektronenmikroskopie; **b).** Ultradünnschnitt Präparate. A. Cellulose Mutante (MAE52 MudJ::*bcsA*), B. Doppelmutante MAE190 (MAE52 MudJ::*bcsA* Δ *csgBA*), C. *rdar* Morphotyp MAE52 (aus Römling *et al.* 1999), D. *saw* Morphotyp MAE51 (MAE32 Δ *csgD*). Bilder von M. Rohde, GBF. Weitere Erklärungen s. Text.

Abb. 21. a. A. zeigt die EM-Aufnahmen der Cellulose-negative Mutante MAE150. Obwohl die Bakterienaggregate, aufgrund der Curli-Fimbrien Produktion, noch von einer extrazellulären Matrix umgeben sind, ist die Struktur dieser Matrix, verglichen zum *rdar* Morphotyp verändert. Die Konsistenz dieser Matrix, verglichen zur Matrix des *rdar* Morphotypes, scheint spröde und schwächer geordnet zu sein. Der *rdar* Morphotyp bildet eine stark ausgeprägte wabenförmige extrazelluläre Matrix, in der die Bakterienzellen eingebettet sind (s. Abb. 21. a. C.) [Römling *et al.* 1999].

Bakterien einer Doppelmutante sind von keiner extrazellulären Matrix umgeben und EM-Aufnahmen gleichen denen des *saw* Morphotyps (s. Abb. 21. a. B. und D.).

Ultradünnschnitt Präparate von der Cellulose- (s. Abb. 21. b. A.) und Cellulose und Curli-Fimbrien- Mutante (s. Abb. 21. b. B.) zeigen ebenso, dass die Bakterien der Cellulose Mutante noch von einer Matrix umhüllt sind, während die Bakterien der Doppelmutante frei von einer extrazellulären Matrix sind.

Diese EM-Untersuchungen zeigen, dass Cellulose eine wichtige extrazelluläre Matrix-Komponente des *rdar* Morphotypes ist und zur vollständigen Ausprägung dieses Morphotypes beiträgt. Im Falle einer Cellulose Mutante verliert der *rdar* Morphotyp seine Stabilität und die honigwaben Struktur wird verändert (s. Abb. 21. a. A. und C.).

III.1.14. Elektronenmikroskopische Analyse der isolierten Cellulose

Es wurden verschiedene Methoden verwendet um Cellulose zu isolieren und anschließend unter dem Elektronenmikroskop (EM) zu betrachten. Ziel war es durch Anwendung unterschiedlicher Isolierungsmethoden Cellulose elektronenmikroskopisch so darzustellen, dass die natürliche Struktur der Cellulose weitgehend bestehen bleibt.

Für die schrägbedampften Präparate, wurde die Cellulose aus NaOH behandelten Bakterienaggregate gewonnen (s. Kap. II.9.4.). NaOH ist eine weit verbreitete und verwendete Base in der Cellulose Industrie und wird zur Gewinnung von Cellulose aus Holz verwendet. Abb. 22. zeigt die EM-Aufnahme eines Cellulose produzierenden *S. Typhimurium* Stammes und einer Cellulose- Mutante. Bei dem Cellulose produzierenden Stamm treten Cellulose Fibrillen auf (s. Abb. 22. A.), die den EM-Aufnahmen von Cellulose Fibrillen isoliert aus der Grünalge *Oozystis solitaria* (www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e26/3.htm) sehr ähneln. Im Gegensatz dazu zeigt die Cellulose Mutante keiner derartigen Struktur (s. Abb. 22. B.). Bei der Struktur im Abb. 22. B. könnte es um residuale „Polysheath“ handeln, die die NaOH Behandlung in Cytoplasma überstanden haben. „Polysheath“ sind defekte Phagen, die nur noch Phagenschwanz-Hüllen produzieren. [Dr. H. Lünsdorf, pers. Mitteilung].

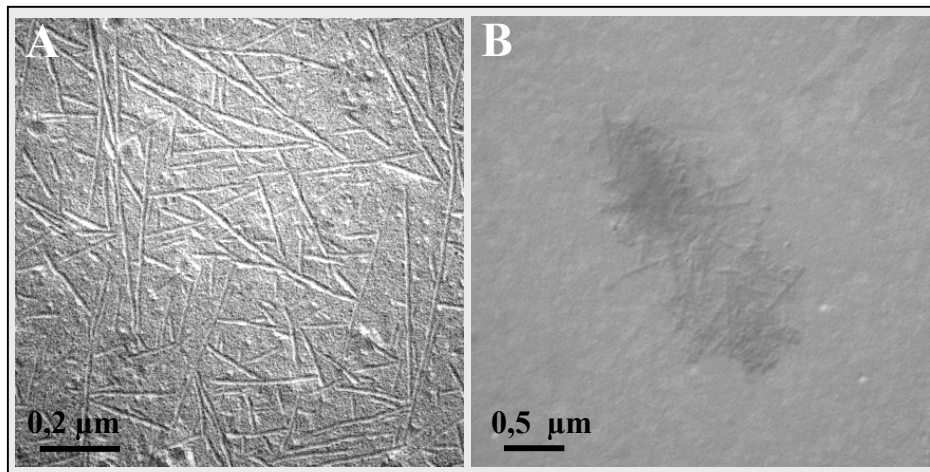


Abb. 22. EM-Aufnahmen schrägbedampfter Präparate von *S. Typhimurium*. **A).** Cellulose produzierender Bakterienstamm (MAE97), **B).** Cellulose Mutante (MAE190). Bilder von H. Lünsdorf, GBF. Weitere Erklärungen s. Text.

Für die Negativkontrastierungs-Methode der EM wurde die Cellulose durch Behandlung der Bakterienaggregaten mit SDS, Merkaptoethanol, DNase, RNase und Proteinase K gewonnen (s. Kap. II.9.3.). Die unterschiedlichen Chemikalien und Enzyme sollten dazu dienen, alle bakteriellen proteinösen Substanzen zu eliminieren, die aufgrund ihrer fibrillären Struktur oder durch Interaktion mit Cellulose, den Nachweis von Cellulose im EM erschweren könnten. Die Cellulose wurde aus dem *S. Typhimurium* Stamm MAE196 isoliert. Dieser Stamm hat ein mutiertes *glgAC* Gen und ist somit nicht in der Lage Glykogen zu produzieren. Die Hälfte der gewonnenen Cellulose wurde mit Cellulase (0,1 mg/ml) über Nacht bei 45°C in Ammoniumacetatpuffer (50 mM, pH 5) verdaut, während die andere Hälfte unter den selben Inkubationsbedingungen nur mit Ammoniumacetatpuffer inkubiert wurde.

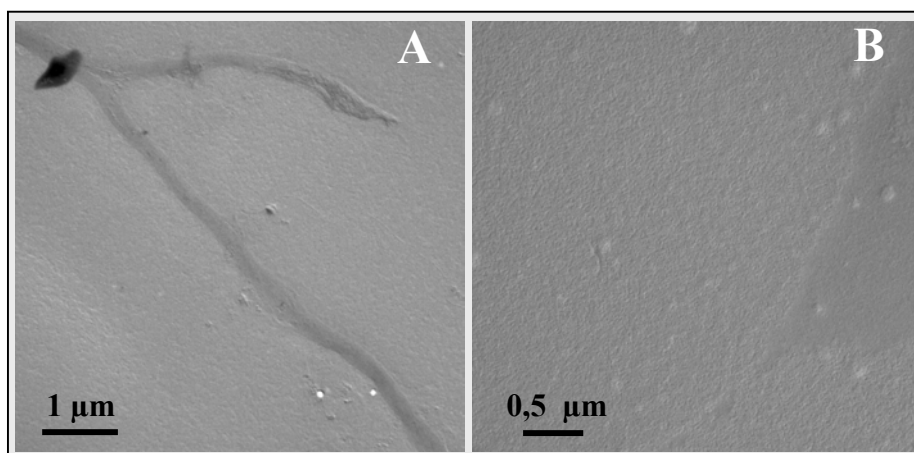


Abb. 23. EM-Aufnahmen aus Cellulase verdauten Proben von *S. Typhimurium* MAE196. **A).** Cellulose wurde nur mit Ammoniumacetat behandelt, **B).** Cellulose wurde mit Cellulase verdaut. Bilder von H. Lünsdorf, GBF. Weitere Erklärungen s. Text.

Nach der Zentrifugation wurde das gewonnene Pellet in Wasser resuspendiert. Bei der nur mit Puffer behandelte Probe, kann man die Cellulose Fibrillen im EM astförmig gebündelt sehen (s. Abb. 23. A.). Während bei der mit Cellulase behandelten Probe keinerlei Struktur zu sehen war (s. Abb. 23. B.).

Abb. 24 zeigt die Cellulose Fibrillen astförmig gebündelt. Cellulose wurde hierfür aus dem *S. Typhimurium* Stamm MAE97 nach Updegraf Methode (s. Kap. II.9.1.) isoliert. Bei dieser Methode bleibt theoretisch, aufgrund der Behandlung der Bakterienaggregate mit Säuren unter hohen Temperaturen, lediglich Cellulose zurück. Bisher wurde noch keine der Cellulose Mutanten mit der Updegraf Methode behandelt. Eine EM-Analyse dieser Mutanten hat noch zu erfolgen.



Abb. 24. EM-Aufnahme von Cellulose, isoliert von *S. Typhimurium* MAE97 nach der Updegraf Methode. Bild von H. Lünsdorf, GBF. Weitere Erklärungen s. Text.

III.1.15. Charakterisierung der Cellulose Operons

S. Typhimurium besitzt zwei divergent transkribierte Operons *bcsABZC* und *bcsEFG*, die an der Cellulose Biosynthese beteiligt sind. Die Cellulose Operons sind schematisch in Abb. 25. dargestellt. Zwischen den beiden Operons liegen in einer Transkriptionseinheit die Gene *yhjR* und *yhjQ*, über deren Funktion noch nichts bekannt ist.

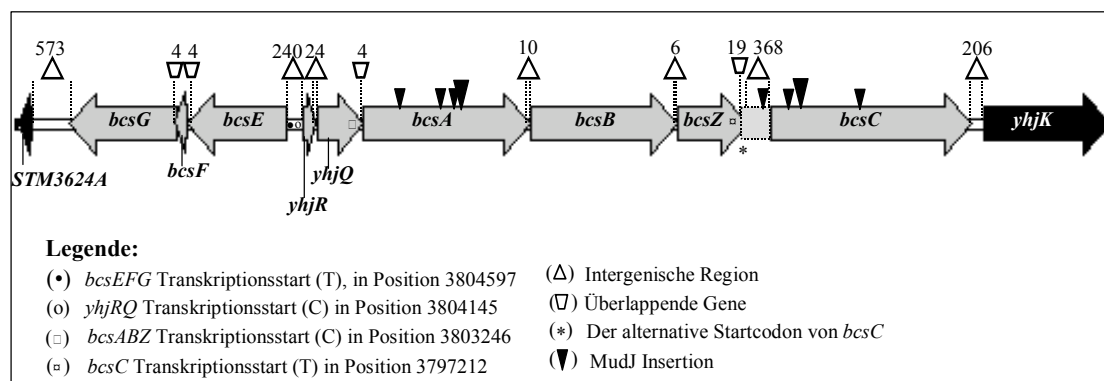


Abb. 25. Anordnung der Cellulose Operons bei *S. Typhimurium* LT2. Weitere Erklärungen s. Text.

Zur Ermittlung der Transkriptionsstartpunkte und zur Analyse der Promotor- Regionen wurde als Referenz die Computeranalyse für das *E. coli* K12- Genom aus der www.cifn.unam.mx/Computational_Genomics/regulondb/ verwendet. Hier ist das *bcsABZC*- Operon in die zwei Transkriptionseinheiten *bcsABZ* und *bcsC* unterteilt. Die putativen Transkriptionsstartpunkte und –10 und –35 Promotor Regionen, der in den Cellulose Operons vorhandenen Transkriptionseinheiten sind in Tab. 8. dargestellt.

Tab. 8. -10 und –35 Box der in den Cellulose Operons befindlichen Transkriptionseinheiten. Zum Konsensus Motiv konservierte Basenpaare sind unterstrichen.

Promotor-Konsensus- Sequenz				
<u>TATAAT</u>		<u>TTGACA</u>	Position Relativ zum	
-35 Box	Bp.	-10 Box	Transkriptionstart	Transkriptionseinheiten
<u>TTG</u> ATT	12	TC <u>TGAT</u>	- 4	<i>bcsEFG</i>
AT <u>G</u> AAA	14	CGT <u>ATT</u>	- 5	<i>yhjRQ</i>
AT <u>G</u> <u>GCG</u>	12	TC <u>G</u> AAA	- 12	<i>bcsABZ</i>
G <u>C</u> <u>GACA</u>	16	TT <u>TCC</u> T	- 12	<i>bcsC</i>

BcsA ist das erste Gen des *bcsABZC* Operons. Stromaufwärts zu *bcsA* liegt das *yhjQ*- Gen, mit dem es 4 bp teilt, während es stromabwärts durch 10 bp von dem *bcsB*- Gen getrennt wird. Das Gen *bcsA* kodiert für die Cellulose Synthase und, verglichen zu den anderen Genen im Operon, ist *bcsA* unter verschiedenen Cellulose produzierenden Bakterienarten am stärksten konserviert [Römling 2002]. Die Cellulose Synthase ist an der Cytoplasma-Membran lokalisiert [Kimura *et al.* 2001; Römling 2002], und es wurde gezeigt, dass BcsA Uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-Glukose) binden kann [Lin *et al.* 1990]. UDP-Glukose dient als Substrat für die Cellulose Biosynthese. Das *bcsA*- Gen und sein Produkt werden in dem Kapitel III.5. ausführlich beschrieben. Das *bcsB*- Gen kodiert für eine cyclic-diguanylic-GMP (c-di-GMP) bindendes Protein, welches ebenfalls in der Cytoplasma-Membran lokalisiert ist. Die c-di-GMP ist als Aktivator der Cellulose Biosynthese in *G. xylinus* identifiziert [Ross *et al.* 1997]. Zwischen *bcsB* und dem stromabwärts gelegenen *bcsZ* Gen sind 6 bp. *BcsZ* kodiert für eine endo-1,4-β-Glucanase [Park und Yun 1999] und ist ebenfalls an der Cellulose Biosynthese beteiligt [Matthysse *et al.* 1995a/b]. Auch auf das *bcsZ* Gen und sein Produkt wird später genauer eingegangen (s. Kap. III.6.). Das Gen *bcsC* kodiert für eine putative Oxidoreduktase und ist für die Cellulose Biosynthese erforderlich. BcsC ist an der Bildung eines membrangebundenen Protein-Komplexes beteiligt, welcher das Extrudieren der Cellulose ermöglicht [Wong *et al.* 1990, Römling 2002]. Das Startkodon des *bcsC* Genes ist in *S. Typhimurium* noch nicht eindeutig definiert. Zur

Zeit werden zwei mögliche Startkodons angegeben, eines bei 3797055- und das zweite bei 3797436 bp im Bezug auf die *S. Typhimurium* LT2 DNA-Sequenz (s. Tab. 10.).

In Abb. 25 sind die Insertionsstellen (schwarzes Dreieck) des MudJ-Transposons in das *bcsA*- und *bcsC*- Gen dargestellt. Je viermal wurde das MudJ in den Genen *bcsA* und *bcsC* inseriert. Die exakten Insertionsstellen sind in der Tab. 9. gezeigt. Die während dieser Arbeit verwendeten Mutanten MAE150 (MAE52 *bcsA*::MudJ) und MAE155 (MAE52 *bcsC*::MudJ) tragen den MudJ in Position 1905 bp in *bcsA* Gen bzw. 834 bp in *bcsC* Gen.

Tab. 9. MudJ-Insertion in den Genen *bcsA* und *bcsC*.

MudJ Insertion (▼) in Position:			
<i>bcsA</i> - Gen	LT2 Genome	<i>bcsC</i> - Gene	LT2 Genome
923	3802545	78	3797133
1512	3801955	633	3796422
1778	3801689	834	3796221
1905	3801562	1661	3795394

Das *bcsE* Gen kodiert für eine putative Protease und teilt mit dem stromabwärts liegendem Gen *bcsF* 4 bp. Das *bcsF* Gen kodiert für ein putatives, inneres Membran Protein. Auch dieses Gen teilt 4 bp mit dem stromabwärts liegendem Gen *bcsG*. *BcsG* kodiert für eine Endoglucanase und wird durch eine intergenische Region von 573 bp von dem nächsten Gen getrennt.

Die Größe der Gene (CDS – Coding DNA Sequence), deren Position und Größe im *S. Typhimurium* LT2 Genom, sowie die Shine-Delgarno Sequenz sind in Tab. 10. zusammengefasst.

Tab. 10. Analyse der Gene bei *S. Typhimurium* LT2. Zum Konsensus Motiv konservierte Basenpaare sind unterstrichen. Weitere Erklärungen s. Text.

Gene	CDS Position in Genome	Grösse (bp)	protein (as); (kDa)	Shine–delgarno sequenc	TAAGGAGGT
<i>bcsG</i>	3806419 - 3808099	1680	560; 62. 2	3806400 – 3806408	AAAGTCAAG
<i>bcsF</i>	3806231 - 3806423	192	64; 7. 2	3806217 - 3806225	CGCGGAGCG
<i>bcsE</i>	3804663 - 3806235	1572	524; 59. 3	3804644 – 3804652	TAAACAGTT
<i>yhjR</i>	3804215 - 3804419	204	68; 7. 6	3804426 – 3804434	AAAGGAGCA
<i>yhjQ</i>	3803462 - 3804191	729	343; 26. 7	3804208 – 3804216	AATGGCGAT
<i>bcsA</i>	3800841 - 3803466	2625	875; 100. 4	3803480 – 3803488	AAACGTCCG
<i>bcsB</i>	3798530 - 3800831	2301	767; 84. 3	3800839 – 3800847	CAATGATGA
<i>bcsZ</i>	3797417 - 3798524	1107	369; 41. 6	3798535 – 3798543	TGACCATGA
<i>bcsC</i>	3793893 - 3797055	*3162	1054; 115.9	3797067 – 3797076	TATCAATCT
(ACCES. Nr. AJ315770)					
<i>bcsC</i>	3793893 - 3797436	3543	1081; 129.8	3797446 – 3797455	TACCTGAC T
(ACCES. Nr. NC_003197)					

Das *bcsABZC* Operon in *S. Typhimurium* Stamm MAE52 ist vollständig sequenziert und unter Acces. Nr. AJ315770 abrufbar, ebenso das erstmals von Solano *et al.* 2002 in der Cellulose Biosynthese von *S. enteritidis* beschriebene *bcsEFG* Operon (Acces. Nr. AJ315148). Beide unter dieser Acces. Nr. befindlichen DNA-Sequenzen sind 100 % identisch zu der komplett veröffentlichten *S. Typhimurium* LT2-Genomsequenz (NC_003197).

III.2. Funktion des BcsZ Proteins in *S. Typhimurium*

BcsZ homologe Proteine in *E. coli* (BcsC) [Park und Yun 1999], *Cellulomonas uda* (CMCase) [Nakamura *et al.* 1986, Park und Yun 1999], *Erwinia chrysanthemi* (CelY) [Guisseppi *et al.* 1991], *Gluconacetobacter xylinus* (EngX) [Wong *et al.* 1990] und *Agrobacter tumefaciens* (CelC) [Matthysse *et al.* 1995b] sind als endo-1,4- β -Glucanase identifiziert worden. Bei *A. tumefaciens* wurde eine direkte Beteiligung der endo-1,4- β -Glucanase in der Cellulose-Biosynthese nachgewiesen [Matthysse *et al.* 1995a]. Auch bei *S. Typhimurium* sollte eine mögliche Beteiligung des BcsZ Proteins in der Cellulose Biosynthese und die Funktion als endo-1,4- β -Glucanase überprüft werden.

III.2.1. Herstellung einer *bcsZ* Mutante und phenotypischer Nachweis einer Beteiligung dieses Genes in der Cellulose Biosynthese

Für die Herstellung einer *bcsZ* Deletions Mutante wurde das *bcsZ* Gen in *S. Typhimurium* MAE52 (rdar Morphotyp) mit dem Primerpaar BcsZ-Start/BcsZ-Stop wie unter Kap. II.12.3. beschrieben, deletiert. Der mutierte Stamm wurde MAE225A genannt. Die Deletion wurde durch PCR in Kombination mit einem Restriktionsverdau überprüft. Mit Hilfe des Primerpaares yhj25/yhjL2 wurden entsprechende PCR Produkte aus MAE52 und MAE225A amplifiziert und anschließend mit XbaI verdaut. Schnittstellen für XbaI liegen nur in der *bcsZ* Gen inserierten Antibiotikaresistenz Kassette. Abb. 26. zeigt den Verdau im Agarosegel.

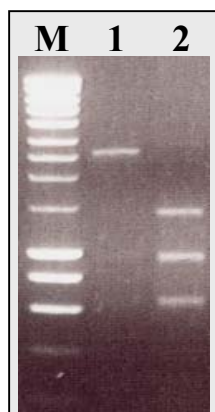


Abb. 26. Überprüfung der Inaktivierung des *bcsZ* Genes durch Verdau der PCR Produkte. M DNA Marker; Spur 1. MAE52; Spur 2. MAE225A (MAE52 $\Delta bcsZ$). Weitere Erklärungen s. Text

Während das PCR Produkt aus dem Stamm MAE52 unverdaut blieb (s. Abb. 26. Spur 1.), wurde das PCR Produkt der Mutante MAE225A verdaut (s. Abb. 26. Spur 2.). Damit wurde die Inaktivierung des *bcsZ* Genes durch die Insertion der Antibiotikaresistenz-Kassette bestätigt.

Um den Einfluss des *bcsZ* Genes auf den *rdar* Morphotyp zu analysieren, wurde die *bcsZ* Mutante MAE225A auf einer CR-Agarplatte ausgestrichen. Die Mutante zeigte den *bdr* Morphotyp, welcher charakteristisch für Cellulose negative Mutanten ist (s. Abb. 27.). Da die Mutante MAE225A im *bcsZ* Gen die Cm-Kassette trägt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der *bdr* Morphotyp dieser Mutante durch einen polaren Effekt auf das stromabwärts gelegene Gen *bcsC* entstanden sein könnte.

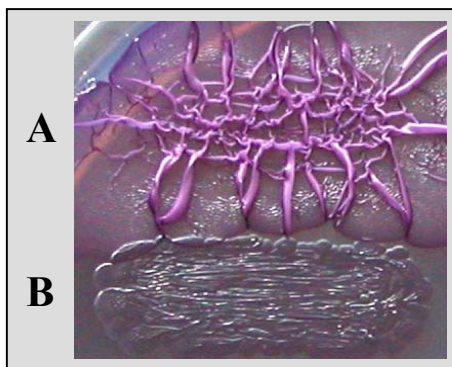


Abb. 27. Der Morphotyp einer *bcsZ* Mutante. Auf einer CR-Agarplatte wurden die Stämme **A.** MAE52 und **B.** MAE225A (MAE52 $\Delta bcsZ$) für 48 h bei 28°C inkubiert. Weitere Erklärungen s. Text.

III.2.2. Klonierung des *bcsZ*- Genes

Das Gen *bcsZ* aus *S. Typhimurium* MAE52 wurde mit Hilfe des Primerpaares BcsZ-A/BcsZ-B amplifiziert und in das Plasmid pBAD30 kloniert. pBAD30 besitzt einen Promotor, welcher die Expression des klonierten Genes mit Hilfe von Arabinose ermöglicht. Das in pBAD30 ligierte *bcsZ* Gen wurde in den *E. coli* Stamm DH5 α transformiert. Anschließend wurde das Plasmid aus einzelnen Klonen isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und HindIII geschnitten, um den Einbau des Inserts zu überprüfen. Zwei Klone wurden getestet.

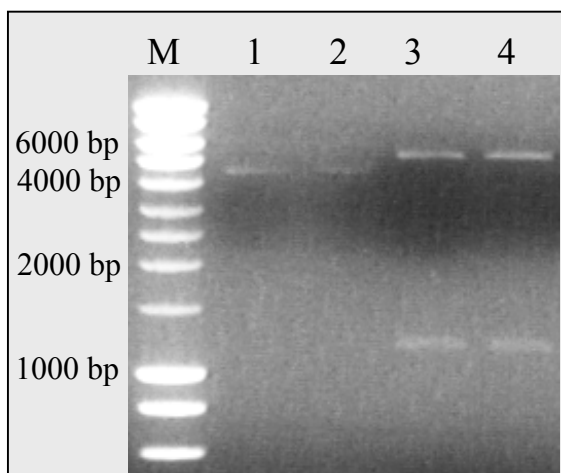


Abb. 28. Restriktionsverdau des Plasmides pXZO62A. M. DNA Marker; Spur 1 und 2 unverdautes Plasmid aus Klon 1 bzw. 2; Spur 3 und 4 XbaI/HindIII geschnittenes Plasmid des Klones 1 bzw. 2. Weitere Erklärungen s. Text.

Abb. 28. zeigt den Verdau im Agarosegel. Spur 1 und 2 zeigt das unverdaute Plasmid der getesteten Klone, während in Spur 3 und 4 das geschnittene Plasmid aufgetragen ist. Hier sind zwei Fragmente zu sehen, die der Größe des *bcsZ* Gens (1107 bp) und des pBAD30 Plasmids (5900 bp) entsprechen. Damit wurde der Einbau des *bcsZ* Genes in pBAD30 bestätigt. Das neue Plasmid (pBAD30 + *bcsZ*) wurde pXZO62A bezeichnet. pXZO62A wurde anschließend über den intermediären *S. Typhimurium* Stamm SH9312 [Bullas und Ryu1983] in die *S. Typhimurium bcsZ* Mutante MAE225A transformiert. Die Expression des *bcsZ* Genes in MAE225A wurde schließlich mittels Western Blot überprüft. Dazu wurden die Expression in MAE225A (pXZO62A) und MAE225A (pBAD30) auf einer LB-Agarplatte mit 0,1 % L-Arabinose induziert, die Bakterien geerntet und für den Western Blot aufgeschlossen. Mit Hilfe des BcsZ-Antikörpers wurde bei dem Stamm MAE225A (pXZO62A) das BcsZ-Protein detektiert, während bei der negativ Kontrolle MAE225A (pBAD30) kein BcsZ Protein nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 29.).

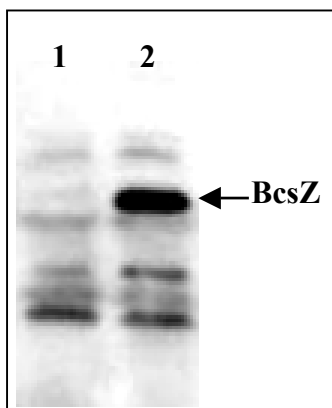


Abb. 29. Detektion des BcsZ Proteins im Western Blot. 1. MAE225A (pBAD30), 2. MAE225A (pXZO62A). Weitere Erklärungen s. Text.

III.2.3. Nachweis der endo-1,4- β -Glucanase Aktivität von BcsZ

Mit Hilfe des Plasmides pXZO62A wurde die Funktion des BcsZ Proteins als endo-1,4- β -Glucanase bei *S. Typhimurium* nachgewiesen. Endo-1,4- β -Glucanasen sind in der Lage Carboxymethylcellulose (CMC) zu hydrolysieren. Hierfür wurde die CMC-Agar-Diffusions-Methode (s. Kap. II.8.10.1.) und die Methode der CR-Färbung eines CMC-SDS-Polyacrylamid-Geles verwendet (s. Kap. II.8.10.2.). Folge der Cellulase Aktivität ist ein gelblicher Hof auf rötlichem Hintergrund sowohl auf einer CR behandelten CMC-Agarplatte, als auch im CMC-SDS-Polyacrylamidgel [Park und Yun 1999].

Abb. 30. zeigt *E. coli* DH5 α (pXZO62A) und DH5 α (pBAD30) auf einer CMC-Agarplatte. Die *bcsZ* Expression wurde durch Zugabe von 0,1 % Arabinose induziert. Der gelbliche Hof bei den DH5 α (pXZO62A) Klonen erscheint als Folge des CMC Abbaus durch die Cellulase, die von den Bakterien ausgeschieden wurde.

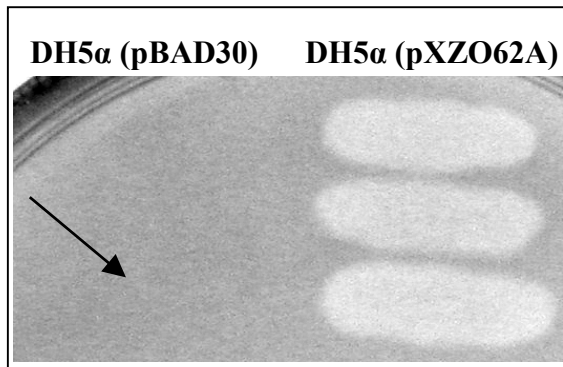


Abb. 30. Endo-1,4-β-Glucanase Aktivität von BcsZ auf CMC-Agarplatte. Weitere Erklärungen s. Text.

Auch in einem CMC-SDS-Polyakrylamidgel zeigte das in der *bcsZ* Mutante komplementierte *bcsZ* Gen (MAE225A (pXZO62A)) im Bereich der erwarteten BcsZ-Proteingröße (41,7 kDa) einen rötlichen Hof und somit endo-1,4-β-Glucanase Aktivität (s. Abb. 31.). Die Probe, isoliert aus einer *bcsZ* Mutante, die nur das Plasmid pBAD30 als Kontrolle enthält, zeigte dagegen keine endo-1,4-β-Glucanase Aktivität.

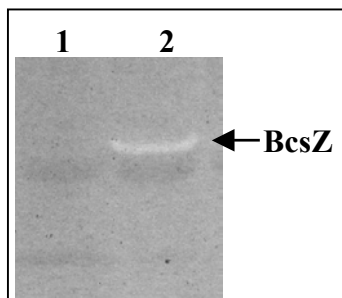


Abb. 31. Endo-1,4-β-Glucanase Aktivität von BcsZ in CMC-SDS-Polyakrylamidgel. 1. MAE225A (pBAD30), 2. MAE225A (pXZO62A). Weitere Erklärungen s. Text.

Es wurde beobachtet, dass die *bcsZ* Mutante MAE225A auf CMC-Agarplatten Cellulase Aktivität zeigte, während auf CMC-SDS-Polyakrylamidgel keine endo-1,4-β-Glucanase Aktivität nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 31. Spur 1.). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass außer der BcsZ Endo-1,4-β-Glucanase auch andere Cellulasen von der Bakterienzelle ausgeschieden werden, die CMC abbauen können.

III.2.4. Lokalisation des BcsZ Proteins

Durch Behandlung der inakten (s. Kap. II.8.12.)- und permeabilisierten (s. Kap. II.8.13.) Bakterienzellen mit Proteinase K sollten mögliche Hinweise über die Lokalisation des BcsZ Proteins geschaffen werden.

BcsZ Protein Detektion intakter Bakterienzellen

Eine Behandlung intakter Bakterienzellen mit Proteinase K degradiert die Proteine, die an der Bakterienoberfläche verankert sind [Loferer *et al.* 1997]. Ob das BcsZ Protein bei einem Verdau intakter Bakterienzellen von Proteinase K degradiert wird, sollte überprüft werden. Hierzu wurden Bakterienzellen von *S. Typhimurium* MAE51 mit Proteinase K in Konzentrationen von 0, 200, 500 und 1000 µg/ml verdaut (s. Kap.

II.8.12.). Die Proben wurden anschließend im SDS-Polyakrylamidgel getrennt und via Western-Blot mit Hilfe des BcsZ Antikörper auf Präsenz des BcsZ Proteins getestet. Abb. 32. zeigt die Detektion des BcsZ Proteins auf einer PVDF- Membran, was darauf hindeutet, dass BcsZ nicht von Proteinase K abgebaut wurde und somit BcsZ kein Oberflächenprotein sein kann. DsbA ist ein periplasmatisches Protein das bei intakten Bakterienzellen von Proteinase K nicht degradiert werden kann und hier als Negativkontrolle benutzt wurde.

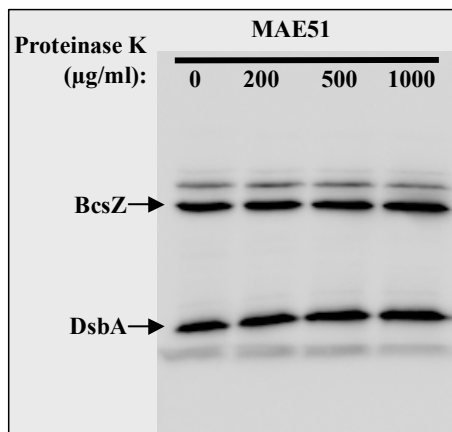


Abb. 32. Detektion des BcsZ Proteins via Western Blot aus intakten und mit Proteinase K behandelten Bakterienzellen. Weitere Erklärungen s. Text.

BcsZ Protein Detektion permeabilisierter Bakterienzellen

Die Permeabilisierung der Bakterienzellen ermöglicht der Proteinase K bis zum periplasmatischen Raum befindlichen Proteine anzugreifen und zu degradieren [Loferer *et al.* 1997]. Um zu testen, ob bei permeabilisierten Bakterienzellen das Protein BcsZ von Proteinase K degradiert werden kann, wurden die Bakterienzellen von *S. Typhimurium* MAE51 wie in Kap. II.8.13. beschrieben permeabilisiert. Abb. 33. zeigt, dass kein BcsZ Protein aus permeabilisierten und mit Proteinase K behandelten Proben detektiert wurde.

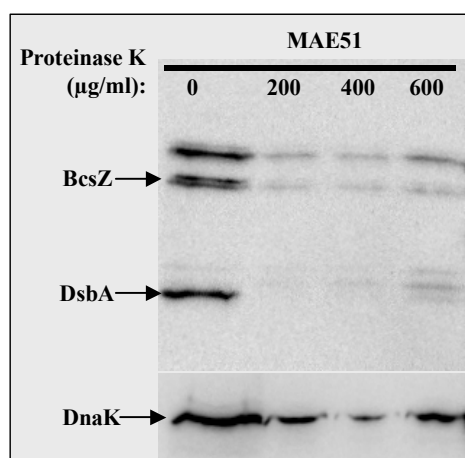


Abb. 33. Detektion des BcsZ Proteins via Western Blot aus permeabilisierten und mit Proteinase K behandelten Bakterienzellen. Weitere Erklärungen s. Text.

DsbA kann bei den permeabilisierten Bakterienzellen von Proteinase K verdaut werden und diente hier somit als Positivkontrolle. Das Cytoplasma-Protein DnaK dient als

Negativkontrolle, das es auch bei permeabilisierten Bakterienzellen von Proteinase K nicht degradiert werden kann. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass BcsZ ein inneres membrangebundenes Protein sein kann.

III.2.5. *bcsZ* - Expression in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Ob die Expression des *bcsZ* Genes wachstumsphasenabhängig ist, wurde durch Detektion des BcsZ Proteins zu verschiedenen Zeiten des bakteriellen Wachstums untersucht. Abb. 34. zeigt die Detektion des BcsZ Proteins aus einer *S. Typhimurium* MAE97 Kultur, die unter mikroaerophilen Bedingungen für 24 h bei 37°C inkubiert wurde (II.8.1.3.). Während des Wachstumsverlaufs wurden Proben entnommen bei OD₆₀₀: 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,3 und nach 24 h Inkubation (OD₆₀₀ 3,3) und für den Western Blot gleiche Proteinmengen auf ein SDS-Polyakrylamidgel aufgetragen. Die gleiche Proteinmengen wurden durch Vergleiche der Protein-Banden aus einem Coomassie-gefärbten Gel geschätzt. Die stärksten BcsZ Proteinsignale wurden bei den Proben detektiert, die bei einer Bakteriendichte von OD₆₀₀ 0,3, 0,5, 0,8 und 1,0 entnommen wurden. Ab OD₆₀₀ 1,0, welche nach 7 h Inkubation erreicht wurde, ist eine kontinuierliche Abnahme des detektierten BcsZ Proteins zu sehen. So wurde das *bcsZ* Gen hauptsächlich während der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert. Mit Eintritt in die stationären Phase nahm die Expression ab.

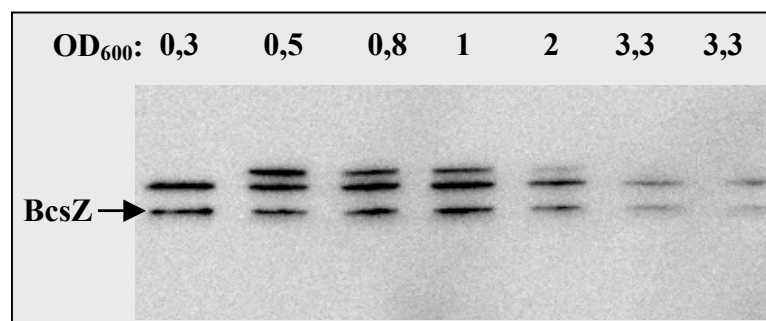


Abb. 34. Detektion des BcsZ Proteins aus einer *S. Typhimurium* MAE97 Kultur in Abhängigkeit von der Wachstumsphase. Weitere Erklärungen s. Text.

III.3. *E. coli* Tob1 exprimiert den rdar Morphotyp

Der rdar Morphotyp (s. Kap. I.1.2.) wurde außer bei *S. Typhimurium* auch bei einigen *E. coli* Isolaten beobachtet (Bian *et al.* 2000, Uhlich *et al.* 2001). Auch das Fäkalisolat *E. coli* Tob1 bildet den rdar Morphotyp [Bokranz 2003]. Die rdar Morphotyp-Expression bei Tob1 wurde durch CR-Bindung sowie durch EM-Analysen der Tob1 Bakterienaggregate untersucht.

Abb. 35. A. zeigt den Tob1 auf einer CR-Agarplatte. Ausbreitung, Oberflächenstruktur und Farbe entsprechen dem rdar Morphotyp von *S. Typhimurium* MAE52 (s. Abb. 2.). Auch die EM-Aufnahme von Tob1 zeigte im Querschnitt eine honigwabenhörmige Struktur (s. Abb. 30. B.), ähnlich der Struktur von MAE52 (s. Abb. 16. a. C.).

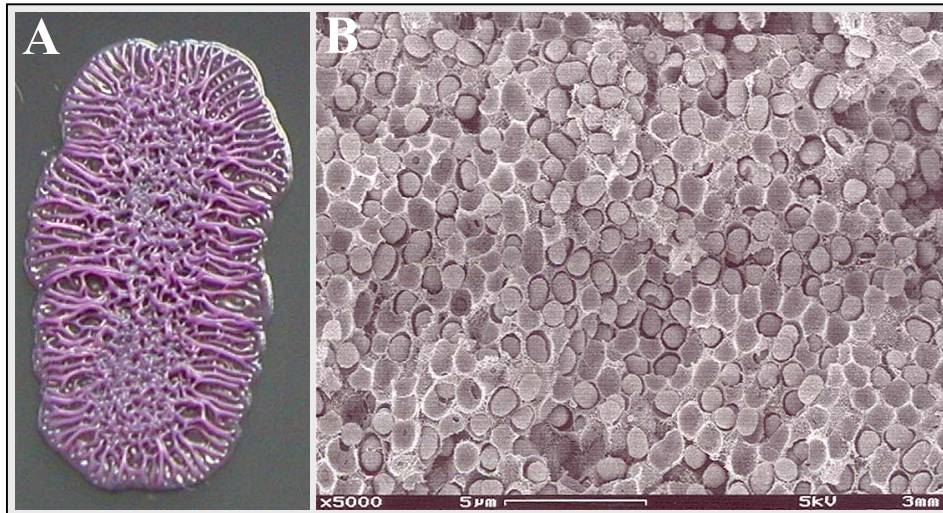


Abb. 35. Expression des rdar Morphotypes bei *E. coli* Tob1. **(A).** Tob1 auf einer CR-Agarplatte, Inkubation 48 h bei 28°C. **(B).** EM-Aufnahme der Bakterienaggregate von Tob1 im Querschnitt. Bild von M. Rohde, GBF. Weitere Erklärungen s. Text.

Die Rolle des rdar Morphotyps in Bezug auf die Bakterien-Wirt-Interaktion ist noch nicht aufgeklärt [Römling *et al.* 2003]. Ob Tob1 den rdar Morphotyp im Wirt oder erst nach Ausscheiden als Anpassungsform an neue Umweltbedingungen exprimiert, ist aus diesen Versuchen nicht zu entnehmen.

III.3.1. Herstellung einer *csgD*- und *bcsA*-Deletions Mutante in Tob1

Da das Fäkalisolat *E. coli* Tob1 den gleichen Morphotyp auf CR-Agarplatten zeigt wie der *S. Typhimurium* Stamm MAE52, wurde eine *csgD*- bzw. *bcsA*- Mutante von Tob1 hergestellt. Auf diese Weise sollte nachgewiesen werden, ob die genetische Regulation der Cellulose und Curli-Fimbrien Biosynthese in *E. coli* Tob1 der in *S. Typhimurium* entspricht. Die Deletions Mutanten wurden mit Hilfe der Datsenko und Wanner beschriebenen Methode hergestellt [Datsenko und Wanner, 2000].

CsgD ist ein Regulatorgen, welches die Curli-Fimbrien und über AdrA die Cellulose Produktion reguliert [Römling *et al.* 1998b/2000]. Zur Inaktivierung des *csgD* Genes in Tob1 wurde das Primerpaar EC-AGFD-Start/EC-AGFD-Stop verwendet (s. Kap. II.12.3.). Die *csgD* Mutante wurde Tob2 benannt. Die *csgD* Mutation wurde mit Hilfe der PCR (Primerpaar EC-AGFD-1/EC-AGFD-2) überprüft. Während das *csgD* PCR Produkt von Tob1 1004 bp groß war, wies das PCR Produkt der *csgD* Mutante (Tob2)

durch die Insertion der Antibiotikakassette eine Größe von 1553 bp auf (s. Abb. 36.). Die PCR Produkte zeigten die erwarteten Fragmentgrößen. Damit wurde die Deletion an *csgD* Gen bestätigt.

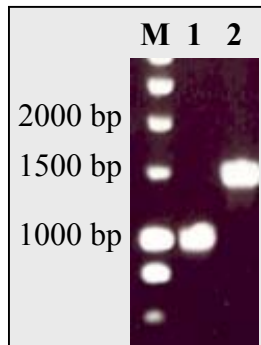


Abb. 36. Elektrophoretische Auftrennung der *csgD*-PCR Produkten von Tob1 und Tob2 im Agarosegel. M. Marker, 1. PCR Produkt aus Tob1, 2. PCR Produkt aus Tob2. Weitere Erklärungen s. Text.

Anschließend wurde die *csgD* Mutante auf CR-Agarplatten ausgestrichen. Die Mutante zeigte den saw Morphotyp (s. Abb. 38.), der denen von *csgD* Mutanten in *S. Typhimurium* entspricht. In Komplementations-Versuchen wurde das Plasmid pUMR15 (pBAD30 mit dem *csgD* Gen) in Tob2 transformiert und *csgD* durch Zugabe von 0,1 % Arabinose in LB (ohne Salz)-Agarplatten induziert. Auf CR-Agarplatten zeigte Tob2 (pUMR15) nicht den rdar sondern den pdar Morphotyp (Curli-Fimbrien negativ, Cellulose positiv). Da das *csgD* Gen in einem Operon mit den an der Curli-Fimbrien Synthese beteiligten Genen *csgEFG* liegt, übt die *csgD* Mutation vermutlich einen polaren Effekt auf die stromabwärts gelegenen Gene *csgEFG*, die somit nicht exprimiert werden können und dadurch eine Curli-Fimbrien Biosynthese verhindern.

Zur Inaktivierung des Cellulose Synthase Genes *bcsA* in Tob1 wurde das Primerpaar EC-BCSA-ATG/EC-BCSA-TGA verwendet. Die *bcsA* Mutante wurde Tob3 benannt. Die Inaktivierung des *bcsA* Genes in Tob1 wurde durch PCR überprüft. Dazu wurden die Primer EC-BCSA-5 und EC-BCSA-6 benutzt. Bei der Verwendung der DNA, isoliert aus Tob1 als Matrize, sollte ein PCR Produkt mit einer Größe von 2839 bp entstehen, während bei der Verwendung der DNA, isoliert aus Tob3 (Tob1 $\Delta bcsA$) ein PCR-Produkt einer Größe von 1397 bp entstehen sollte. Abb. 37 zeigt die PCR-Produkte aufgetrennt in einem Agarosegel. Die PCR Produkte zeigten die erwarteten Fragmentgrößen und bestätigten damit die Deletion des *bcsA* Genes.

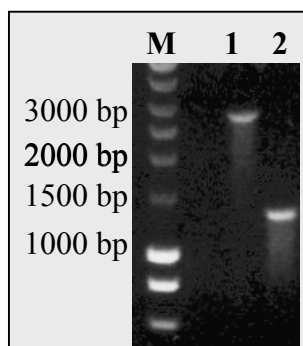


Abb. 37. Elektrophoretische Auftrennung der *bcsA*-PCR Produkten von Tob1 und Tob2 im Agarosegel. M. Marker, 1. PCR Produkt aus Tob1, 2. PCR Produkt aus Tob3. Weitere Erklärungen s. Text.

Die *bcsA* Mutante Tob3 exprimierte auf CR-Agarplatten den Curli-Fimbrien positive aber Cellulose negativen *bda* Morphotyp (s. Abb. 38.), der ebenfalls charakteristisch für *bcsA* Mutanten in *S. Typhimurium* ist.

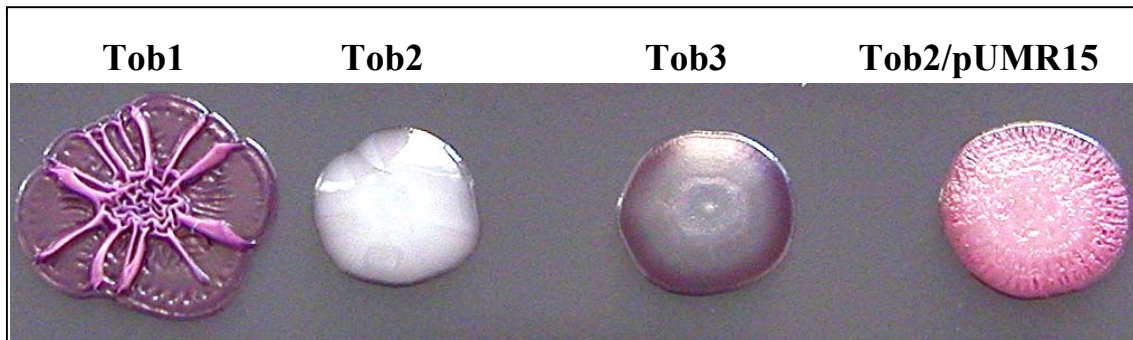


Abb. 38. Die Morphotypen von Tob1 und seiner isogenen Mutanten auf T-Medium-CR-Agarplatte. Tob1 (wt), Tob2 (Tob1 $\Delta csgD$), Tob3 (Tob1 $\Delta bcsA$) und Tob2/pUMR15 ($\Delta csgD$ Komplementation). Weitere Erklärungen s. Text.

III.3.2. GC/MS-Nachweis der Cellulose, isoliert aus den Tob1-Bakterienaggregaten

Ob der *rdar* Morphotyp von *E. coli* Tob1 Cellulose exprimiert, wurde durch die Updegraf-Methode und anschließende GC/MS Analyse getestet. Dazu wurden die Bakterienaggregate von Tob1 mit heißen Säuren behandelt. Bei dieser Behandlung der Bakterienaggregate würde nur Cellulose als einziges Kohlenhydrat übrigbleiben. Die isolierten Proben wurden anschließend im GC/MS analysiert. Bei allen Proben wurde Glukose detektiert, die einem GC/MS Chromatogramm, ähnlich dem in Abb. 12. A. entsprechen. Das Fäkalisolat *E. coli* Tob1 ist somit in der Lage Cellulose zu bilden.

III.4. Untersuchungen auf Cellulose- und Curli-Fimbrien Bildung bei diversen Fäkalisolate der Enterobakterien

III.4.1. Expression des multizellulären Morphotypes

Gattungen der Familie Enterobacteriaceae wie Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella, Proteus usw. können Biofilm-assoziierte Infektionen wie z.B. Gallen Infektionen, bakterielle Prostatitis und Katheder-assoziierte Infektionen verursachen. Der Gastrointestinal-Trakt stellt ein Reservoir dieser Bakterien dar. Im Labor war eine Auswahl von Isolaten von verschiedene Spezies vorhanden [Bokranz 2003]. Diese Isolate wurden auf ihre Fähigkeit einen multizellulären Morphotyp zu exprimieren analysiert. Dazu wurden sie auf CR- und CF-Agarplatten ausgestrichen. Die Farbstoff-

bindung der Bakterienkolonien lieferte Hinweise auf mögliche Cellulose und/oder Curli-Fimbrien Produktion.

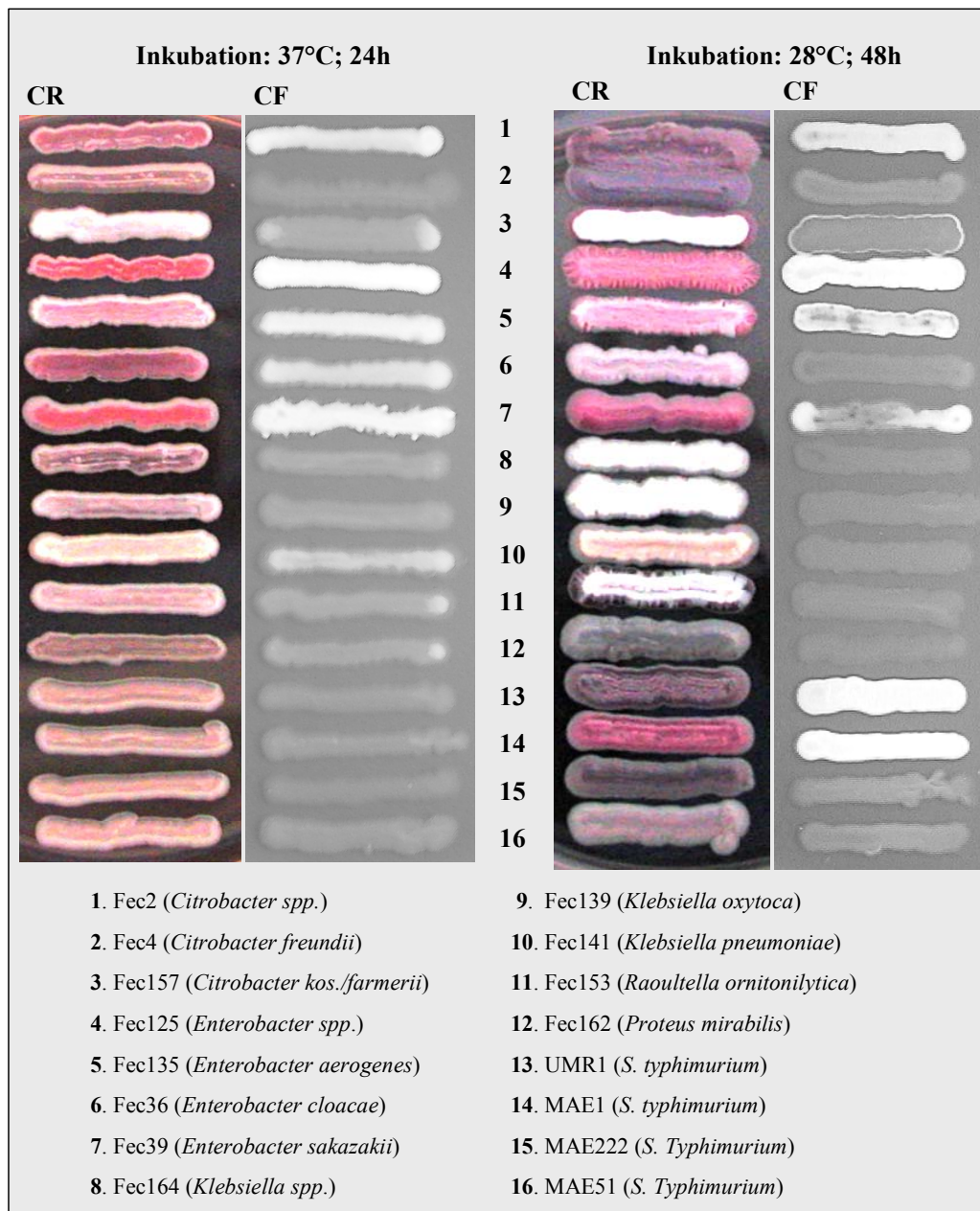


Abb. 39. CR- und CF-Bindung von ausgewählten Fäkalisolaten der Enterobakterien. *S. Typhimurium* Stämme dienten als Kontrolle und bei 28°C zeigten die vier charakteristischen Morphotypen: UMR1 (rdar), MAE1 (pdar), MAE222 (bdar) und MAE51 (saw). Weitere Erklärungen s. Text.

Abb. 39. zeigt die getesteten Fäkalisolate auf CR- und CF-Agarplatten. Während *Citrobacter* spp. Fec2 und *C. freundii* Fec4 auf CR-Agarplatten (Inkubation bei 28°C für 48 h) den rdar (Cellulose- und Curli-Fimbrien produzierend) Morphotyp exprimierten, bildeten sie bei einer Inkubation von 24 h bei 37°C den pdar Morphotyp (Cellulose produzierend). *Enterobacter* spp. Fec125, *E. aerogenes* Fec135, *E. cloacae* Fec36 und *E. sakazakii* Fec39 bildeten den Cellulose produzierenden pdar Morphotyp

auf CR-Agarplatten sowohl bei 37°C als auch bei 28°C. Die Expression des pdar Morphotypes bei 28°C für Fec135 und Fec36 fiel dabei etwas schwächer aus. Die Fäkalisolate *Citrobacter kos./farmerii* Fec157, *Klebsiella spp.* Fec164, *K. oxytoca* Fec139, *K. pneumoniae* Fec141, *R. ornithinolytica* Fec153 und *P. mirabilis* Fec162 zeigten auf CR-Agarplatten weder bei 28°C noch bei 37°C einen Morphotyp, der Hinweise auf Cellulose oder Curli-Fimbrien Bildung geben konnte.

Die Calcoflour-Bindung sollte zusätzliche Hinweise auf Cellulose Produktion liefern. Calcoflour bindet an Cellulose und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV von $\lambda = 366$ nm. Im Allgemeinen korrelierte die Expression des rdar- und pdar-Morphotypes auf CR-Agarplatten mit der Calcoflour-Bindung. So fluoreszierten die Stämme Fec2 (rdar) und Fec125 sowie Fec135 und Fec39 (pdar) auf CF-Agarplatten bei beiden Temperaturen. Fec36 zeigte bei 37°C Fluoreszenz, nicht jedoch bei 28°C. Auch *C. freundii* Fec4 zeigte in diesem Experiment keine Fluoreszenz, trotz seines rdar- (bei 28°C) oder pdar (bei 37°C) Morphotypes. Dies zeigt, dass Kongorot- und Calcoflour-Bindung nicht notwendigerweise miteinander korrelieren.

III.4.2. Untersuchungen auf Cellulose/Curli-Fimbrien Produktion und Biofilm Bildung bei *C. freundii* Fec4 und *E. sakazakii* Fec39

Citrobacter freundii Fec4 exprimiert auf CR-Agarplatten bei 28°C den rdar-Morphotyp, während *Enterobacter sakazakii* Fec39 den pdar Morphotyp sowohl bei 28°C als auch bei 37°C zeigt. Im Folgenden wurden diese zwei Stämme näher auf ihre Cellulose- und Curli-Fimbrien Produktion untersucht.

Mikroskopische Untersuchungen

Bakterien von Fec4 und Fec39 wurden von einer LB (ohne Salz) Agarplatte (Inkubation: 48h bei 28°C) entnommen und in Calcoflour-Lösung resuspendiert. Im Phasenkontrast wurde eine unterschiedliche Konsistenz der Bakterienaggregate beider Stämme beobachtet. Die Bakterienaggregate von Fec4 waren stärker ausgeprägt als die von Fec39 (s. Abb. 40. Phasenkontrast). In der Fluoreszenz Mikroskopie wurden bei Fec4 fluoreszierende Bakterienaggregate gesehen, die sehr dem Fluoreszenz Bild von *S. Typhimurium* MAE52 gleichen (s. Abb. 19. B. MAE52, Fl.) letzteres ist auf die Co-Expression von Cellulose und Curli-Fimbrien zurückzuführen (s. Abb. 19. B. MAE52, Fl.). Fec39 zeigte in der Fluoreszenz Mikroskopie eine fibrilläre Struktur (s. Abb. 40. Fluoreszenz), die den Cellulose Fibrillen des nur Cellulose produzierenden *S. Typhimurium* Stammes MAE97 gleicht (s. Abb. 19. B. MAE97, Fl.).

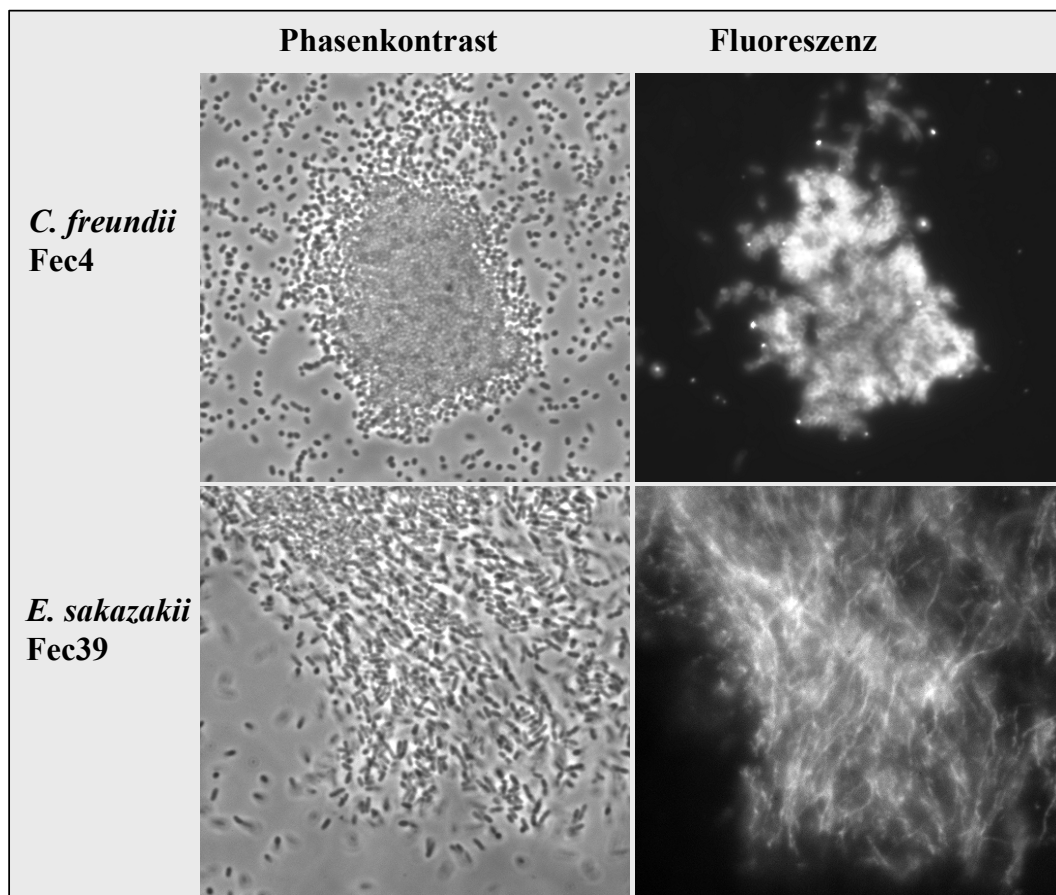


Abb. 39. Mikroskopische Aufnahmen der mit CF gefärbten Bakterienaggregate von *C. freundii* Fec4 und *E. sakazakii* Fec39. (600 x). Weitere Erklärungen s. Text.

GC/MS-Nachweis der Cellulose, isoliert aus den Bakterienaggregaten der Fäkalisolate *C. freundii* Fec4 und *E. sakazakii* Fec 39

Aus den phänotypischen Untersuchungen geht hervor, dass Fec4 und Fec39 Cellulose produzieren. Um dies biochemisch zu überprüfen wurden Bakterienaggregate von Fec4 und Fec39 mit heißen Säuren nach der Updegraff-Methode (s. Kap. II.9.1.) behandelt, um vermutete Cellulose zu isolieren und dann die Cellulose Untereinheit Glukose im GC/MS zu detektieren. Das GC/MS Chromatogram zeigte einen Glucose Wert vergleichbar mit dem von isolierter Cellulose aus *S. Typhimurium* (s. Abb. 16. A.). Die Behandlung der Bakterienaggregate nach der Updegraff-Methode führt zur Zerstörung aller anderen bakteriellen Kohlenhydrate außer der kristallinen Cellulose. Die detektierten Glukose Moleküle stammen somit aus der abgebauten Cellulose.

Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass unter den getesteten Wachstumsbedingungen bei Expression eines multizellulären Morphotypes in den Stämmen Fec4 und Fec39 die extrazelluläre Matrix wie auch bei *S. Typhimurium* aus Cellulose und Curli-Fimbrien besteht.

Untersuchungen auf Biofilmbildung bei Fec4 und Fec39

Der rdar Morphotyp von *S. Typhimurium* zeigt ein stark ausgeprägte Pellikel Bildung und Adhärenz an Glas (s. Abb. 3.), während *S. Typhimurium* Stämme, die keine Cellulose oder Curli-Fimbrien produzieren kein Pellikel bilden und keine Adhärenz aufweisen [Römling *et al.* 2000]. Pellikel Bildung und Adhärenz an Glass wurden für *C. freundii* Fec4 und *E. sakazakii* Fec39 untersucht.

Der Nachweis der Pellikel Bildung wurde wie in Kap. II.8.7.2. beschrieben durchgeführt. Die Kulturen wurden für 48 h bei 28°C inkubiert. Beide Stämme konnten durch Zellaggregation an der Flüssigkeit/Luft Grenze ein Pellikel bilden (s. Abb. 41.).

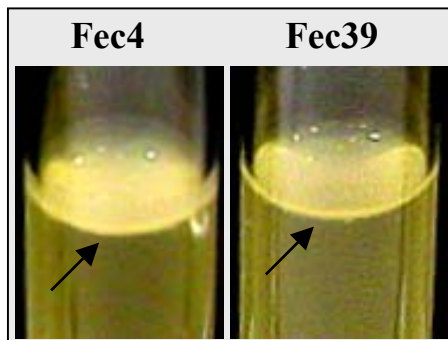


Abb. 41. Pellikelbildung bei *C. freundii* Fec4 und *E. sakazakii* Fec39. Der Pfeil zeigt das Pellikel an der Flüssigkeit/Luft Grenze.

Für den Adhärenz Test wurden 5 ml LB (ohne Salz) Medium mit dem Fec4 bzw. Fec39 Stamm beimpft und bei 28°C für 48h in einem Reagenzglass inkubiert. Die stärkste Adhärenz an Glass wurde bei Fec4 beobachtet, wenn die Kultur bei 180 upm rotierte, während bei Fec39 eine Rotation der Kultur von 210 upm zu einer stärkeren Adhärenz der Bakterien an Glass führte. Nach Inkubation wurden die Proben mit Kristallviolett gefärbt (s. Kap. II.8.7.5.). Abb 42. zeigt die Adhärenz von Fec4 und Fec39 an Glas. Ähnlich wie für bei *S. Typhimurium* MAE52 (rdar Morphotyp) beobachtet wurde, dass die Co-Expression von Cellulose und Curli-Fimbrien zu einer stärkeren Adhärenz an Glass führt (s. Abb. 3.), so wurde auch bei Fec4, welcher den rdar Morphotyp bei 28°C exprimiert eine starke Adhärenz beobachtet. Fec39, der den pdar Morphotyp exprimiert (Cellulose produzierend) zeigt verglichen zu Fec4 eine reduzierte Adhärenz.

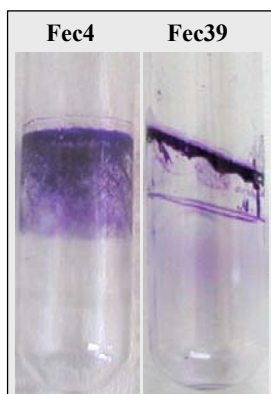


Abb. 42. Adhärenz an Glass bei *C. freundii* Fec4 und *E. sakazakii* Fec39.

Nachweis von CsgA Protein auf dem Western Blot

Das CsgA-Protein ist die Untereinheit der Curli-Fimbrien, die durch Polymerisation der CsgA-Proteine entstehen [Collinson *et al.* 1991, Römling *et al.* 1998a]. Die Hypothese, dass *C. freundii* Fec4 Curli-Fimbrien bildet, nicht jedoch *E. sakazakii* Fec39, wurde durch Nachweis des CsgA Proteins auf dem Western Blot überprüft. Dazu wurden Bakterien von Fec4 und Fec39 von einer LB (ohne Salz) Agarplatte (Inkubation: 48h bei 28°C) geerntet und wie in Kap. II.10.4.1. und II.10.4.2. beschrieben behandelt. Mit Hilfe des α -CsgA Antikörpers wurde dann das Protein CsgA, welches eine Molekulargröße von 17 kDa hat, detektiert. Abb. 43. zeigt die Detektion von CsgA. Während bei Fec4 CsgA nachgewiesen werden konnte, wurde bei Fec39 kein CsgA detektiert. Dieses Resultat bestätigt die Annahme, dass unter diesen Wachstumsbedingungen Fec4 Curli-Fimbrien produziert und Fec39 nicht.

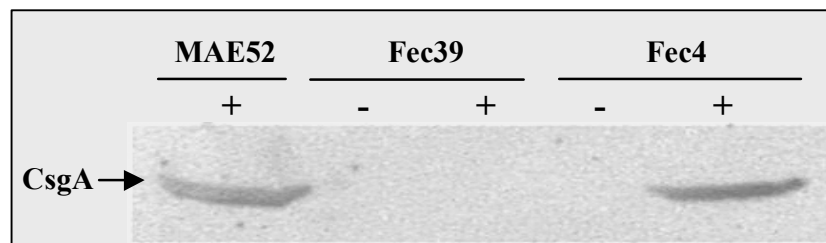


Abb. 43. Western Blot der Curli-Fimbrien Untereinheit CsgA. Eine Detektion des Proteins CsgA ist nur dann möglich, wenn die Probe mit 90 % Ameisensäure depolymerisiert wird. (+) mit Ameisensäure behandelte Probe, (-) keine Ameisensäure Behandlung der Probe. Fec39 (*E. sakazakii*), Fec4 (*C. freundii*) und als positiv Kontrolle *S. Typhimurium* MAE52.

III.4.3. Identifizierung des CsgA Proteins bei *Citrobacter spp.* Fec2 durch Q-TOF

Durch die Sequenzierung des *csgA* Genes wurde festgestellt, dass *Citrobacter spp.* Fec2 die genetische Information für die Curli-Fimbrien Biosynthese enthält. Ob das Fäkalisolat Fec2 den bdar Morphotyp als Folge der Curli-Fimbrien Expression als einzige extrazelluläre Matrixkomponente bildet, wurde durch Detektion der Curli-Fimbrien Untereinheit CsgA überprüft.

Dazu wurden 5 mg Bakterien von Fec2 von einer 48 h bei 28°C inkubierte LB (ohne Salz) Agarplatte geerntet, nach Ameisensäure-Behandlung in 20 μ l Probenpuffer resuspendiert und für die Coomassie-Färbung auf SDS-Polyakrylamidgel aufgetragen. Parallel dazu wurde eine Probe von *S. Typhimurium* MAE52 aufgearbeitet um das CsgA Protein als Kontrolle zu benutzen. Ein Fragment der CsgA Proteingröße (17 kDa) wurde auch bei *Citrobacter spp.* Fec2 im Coomassie-Gel beobachtet (s. Abb. 44).

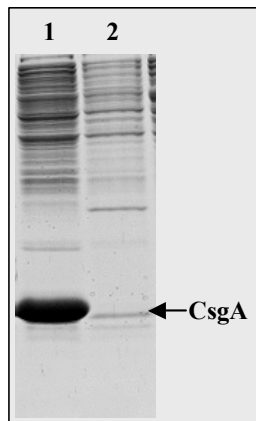


Abb. 44. Detektion des CsgA-Proteins in einem SDS-Polyakrylamidgel. 1. *S. Typhimurium* MAE52 (positiv Kontrolle); 2. *Citrobacter* spp. Fec2.

Um nachzuprüfen, ob es sich bei diesem Fragment tatsächlich um das CsgA Protein handelt, wurde die Proteinbande aus dem Polyakrylamidgel ausgeschnitten und für den Q-TOF aufgearbeitet (s. Kap. II.10.5.). Drei Peptide wurden im Q-TOF sequenziert, die zu dem sequenzierten CsgA-Proteinsequenz von Fec2 identisch waren (s. Abb. 45.). Unter den getesteten Bedingungen exprimiert *Citrobacter* spp. Fec2 den bdar Morphotyp auf CR-Agarplatten als Folge der Curli-Fimbrien Produktion.

MKLLQVAAFAAIVVSGSALAGSVPQWGGGGGGGGSSSGPESTLSIYQSGVN
NAALALQSDARKSDTTIHQNGFGNGADVGGQGSDNSTIDLTQNGFKNNATIDQ
WNGKNSDITVSQYGGHNAALVNQTASDSSVLVHQVGFGNNATANQY

Abb. 45. Die CsgA Proteinsequenz von *Citrobacter* spp. Fec2. Die unterstrichenen Peptide sind mit Hilfe von Q-TOF identifiziert worden.

II.4.4. Nachweis des *bcsA* Genes bei diversen Enterobakterien

Phenotypische Untersuchungen haben gezeigt, dass einige Fäkalisolate der Familie Enterobacteriaceae keine Cellulose produzieren können. Ob das Fehlen der Cellulose Produktion aufgrund der Abwesenheit des Cellulose Synthase Genes *bcsA* zurückzuführen ist, sollte durch Amplifizierung und Sequenzierung des Genes überprüft werden.

Amplifizierung des *bcsA* Genes

Chromosomale DNA aus *E. cloacae* Fec36, *E. aerogenes* Fec153, *C. koserii/farmerii* Fec157, *K. oxytoca* Fec139, *K. pneumoniae* Fec141 und *R. ornithinolytica* Fec153 wurde isoliert und das *bcsA* Gen amplifiziert. Die PCR erfolgte mit Hilfe von Primern, die in Sequenzen lagen, die zwischen *E. coli* und *S. Typhimurium* stark konserviert waren. Mit dem Primerpaar ES-BCSA162/ES-BCSA681 konnte das Gen *bcsA* bei allen getesteten Fäkalisolaten der Enterobakterien amplifiziert werden (s. Abb. 46.).

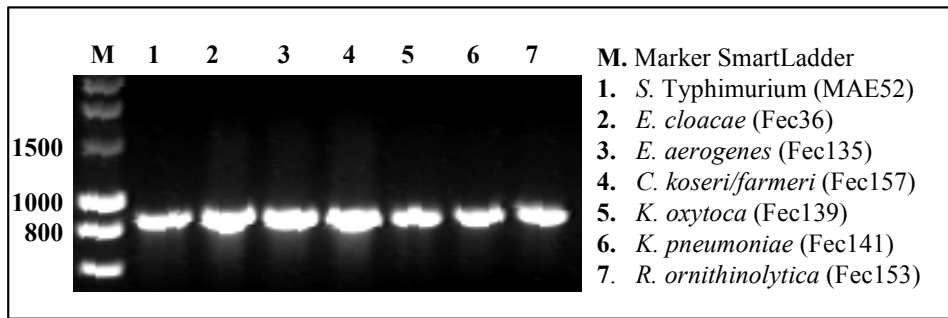


Abb. 46. PCR-Produkt des *bcsA* Genes bei diversen Fäkalisolaten der Enterobakterien im Agarosegel. *S. Typhimurium* MAE52 dient als Positivkontrolle.

Sequenzierung des *bcsA* Genes

Für die Fäkalisolaten *Citrobacter* spp. Fec2 und *E. sakazakii* Fec39 wurde das gesamte *bcsA* Gen sequenziert und mit dem Cellulose Synthase Gen von *S. Typhimurium* verglichen. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der Primerpaare (BCSA74A/BCSA70, BCSA74/BCSA86, BCSA62/BCSA62A), die ebenfalls aus konservierten Bereichen der *S. Typhimurium*- und *E. coli*- DNA-Sequenz stammen. Für die Sequenzierung des *bcsA* Genes von *E. sakazakii* wurde auch noch das Primerpaar ES-BCSA162/ES-BCSA681 benutzt. Die Homologie des *bcsA* Genes von Fec2 und Fec39 zum *S. Typhimurium* *bcsA* lag bei 81 % bzw. 77 %. Die Sequenzen sind unter der Acces. Nr. AJ515698 für *C. freundii* und AJ515699 für *E. sakazakii* abrufbar.

III.4.5. Amplifizierung und Sequenzierung der Curli-Fimbrien Gene bei diversen Enterobakterien

Die zwei divergent transkribierten Operons, *csgDEFG* und *csgBAC*, kodieren für die Curli-Fimbrien Bildung. Das Gen *csgD* reguliert über *adrA* auch die Cellulose Biosynthese [Römling *et al* 1998a/2000]. Inwieweit die genetische Information für die Curli-Fimbrien Biosynthese in verschiedenen Fäkalisolate der Enterobakterien vorhanden ist wurde im Folgenden analysiert.

Amplifizierung des *csgA* Genes

csgA kodiert für die Untereinheit der Curli-Fimbrien und wurde mit Hilfe des konservierten Primerpaares AGFA66/AGFA60 amplifiziert. Abb. 47. zeigt die PCR-Produkte im Agarosegel mit der erwarteten Fragmentgröße (1301 bp.) in den getesteten Stämmen. Bei *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. kos./farmerii* und *R. orinithinolytica* konnte das Gen *csgA* amplifiziert werden, während bei *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* keine *csgA* PCR Produkt gebildet wurde. Trotz der Präsenz des *csgA* Genes in *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. kos./farmerii* und *R. orinithinolytica*, zeigten diese Stämme unter den getesteten Bedingungen keinen phenotypischen Hinweis auf Curli-Fimbrien Bildung (s.

Abb. 39.). *K. oxytoca* und *K. pneumoniae* zeigten ebenfalls kein Curli-Fimbrien Expression. Dies könnte auf das Fehlen des *csgA* Genes zurückzuführen sein.

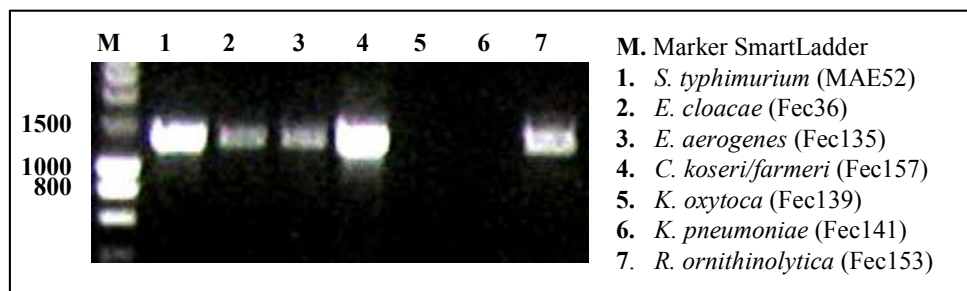


Abb. 47. PCR Produkt des *csgA* Genes bei diversen Fäkalisolaten der Enterobakterien im Agarosegel. *S. Typhimurium* MAE52 diente als Kontrolle.

Sequenzierung der Gene *csgD*, *csgB* und *csgA*

Die Curli-Fimbrien Gene *csgD*, *csgB*, *csgA* und die intergenische Region (IR) zwischen *csgD* und *csgB* der Fäkalisolate *Citrobacter* spp. Fec2, *C. freundii* Fec4 und *E. sakazakii* Fec39 wurde sequenziert. Phenotypischen Untersuchungen zeigten, dass Fec2 und Fec4 Curli-Fimbrien produzieren, während Fec39 keine Curli-Fimbrien unter den getesteten Bedingungen bildete (s. Abb. 39.). Durch Sequenzierung der *csg* Gene dieser Fäkalisolate konnte die Homologie der Curli-Fimbrien Gene zu den *csg* Genen von *S. Typhimurium* bestimmt werden. Für *E. sakazakii* Fec39 wurde damit ebenfalls die Präsenz der genetischen Information der Curli-Fimbrien nachgewiesen.

Dazu wurden die Gene *csgD*, *csgB*, *csgA* und die IR zwischen *csgD* und *csgB* mit Hilfe der ausgesuchten Primerpaare AGFA66/AGFA60, EC-AGFD1/EC-AGFD2 und FEC-IRD/FEC-IRB, die zwischen *S. Typhimurium* und *E. coli* in konservierten Bereichen liegen, in Fec2, Fec4 und Fec39 amplifiziert und anschließend sequenziert. Der sequenzierte Bereich ist in Abb. 48. schematisch dargestellt.

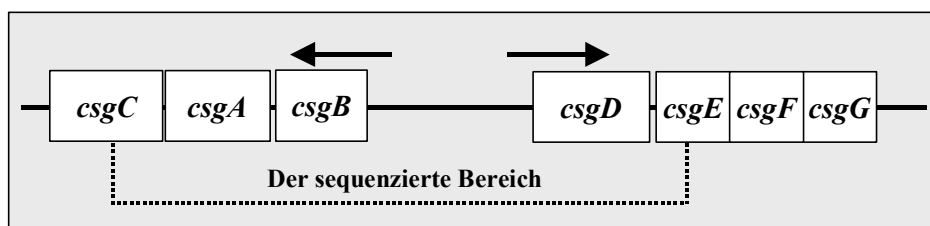


Abb. 48. Schematische Darstellung der Curli-Fimbrien Operons. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung der Operons.

Die Homologie von *csgD*, *csgB* und *csgA* von Fec2, Fec4 und Fec39 zu den entsprechenden *S. Typhimurium* Curli-Fimbrien Genen ist in Tab. 11. zusammengefasst. Die *csg* Gene von *Citrobacter* spp. Fec2, *C. freundii* Fec4 und *E. sakazakii* Fec39 zeigten eine hohe Homologie zu denen in *S. Typhimurium*. Während Fec2 und Fec4 Curli-Fimbrien bilden, trat keine Curli-Fimbrien Expression bei Fec39 auf trotz

der Präsenz der Curli-Fimbrien Gene. Die Sequenzen sind unter folgenden Acces. Nr. abrufbar: AJ515700 *csgD-csgBA* Fec2; AJ515701 *csgD-csgBA* Fec4 und AJ515702 *csgD-csgBA* Fec39.

Tab. 11. Die Homologie der Gene *csgD*, *csgB* und *csgA* von *Citrobacter spp.* Fec2, *C. freundii* Fec4 und *E. sakazakii* Fec39 zu *S. Typhimurium* LT2.

	Fec2	Fec4	Fec39
<i>csgD</i>	83 %	83 %	78 %
<i>csgB</i>	85 %	81 %	75 %
<i>csgA</i>	81 %	74 %	69 %

III.5. Analyse des Proteins BcsA

Verglichen mit den anderen an der Cellulose Biosynthese beteiligten Proteinen ist das Cellulose Synthase Protein BcsA bei den verschiedenen Bakterienarten am stärksten konserviert. Dies trifft insbesondere für den mittleren Bereich des BcsA Proteins zu, welcher das D,D,D35QXXRW Motiv trägt. Das D,D,D35QXXRW Motiv ist ausser für die Cellulose Synthase auch für die Chitin- und Curdlan- Synthase charakteristisch [Stasinopoulos *et al.* 1999, Römling 2002]. Die Präsenz des Cellulose Synthase Proteins, welches das QXXRW Motiv enthält, in dem rosetten terminalen Komplex der Pflanzen ist durch Immunogold Markierung dieses Proteins experimentel nachgewiesen worden [Kimura *et al.* 1999]. Das QXXRW Motiv scheint zumindest bei den Pflanzen unerlässlich für die Cellulose Biosynthese zu sein, denn eine Mutation hier führt zu einem abnormalen Wachstum der Pflanzen [Saxena *et al.* 1994; Brown 2004]. Auch das Cellulose Synthase Protein von *Ciona intestinalis* (Tierreich) enthält das konservierte D,D,D35QXXRW Motiv [Nakashima *et al.* 2004].

Außer dem Motiv D,D,D35QXXRW sind auch fünf weitere konservierte Motife PVDPYE, HAKAGN, QTP, FFCGS und RFLPL in diesem Bereich zu finden. Während die ersten drei Motive bei Cellulose- und Curdlan- Synthase vorkommen, fehlen die Motive FFCGS und RFLPL fast immer bei Curdlan Synthesen [Römling 2002]. Die Curdlan Synthase (1-3-β-Glukan) von *Agrobacterium spp.* ist sehr verwandt zu bakteriellen Cellulose Synthase (Ähnlichkeit: 46 %, Identität: 26 %) [Stasinopoulos *et al.* 1999, Römling *et al.* 2002].

Das Cellulose Synthase Protein BcsA ist in der Cytoplasma Membran lokalisiert und enthält 8-10 Transmembrandomainen [Richmond 2000; Römling 2002]. BcsA kann das Substrat für die Cellulose Biosynthese UDP-Glukose binden [Lin *et al.* 1990].

In Abb. 49. ist der mittlere konservierte Bereich des BcsA Proteins von *S. Typhimurium*, *E. coli*, *Citrobacter spp.*, *E. sakazakii*, *K. pneumoniae* und *P. putida* als Alignment dargestellt. Das BcsA Protein von *E. sakazakii* zeigt auffallende Unterschiede in den Motiven PVDPYE und FFCGS zu denen anderer getesteter Stämme. Die Homologie des *S. Typhimurium* BcsA Proteins zu den BcsA Homologen der getesteten Stämme beträgt 94 % für *E. coli*; 95 % für *Citrobacter spp.*, 76 % für *E. sakazakii*, 90 % für *K. pneumoniae* und 66 % für *P. putida*. Die Angaben sind für das vollständige BcsA Protein berechnet. Mit U1-U4 sind die Homologen Bereiche des BcsA zu der Cellulose Synthase eukariotischer Zellen dargestellt [Römling 2002].

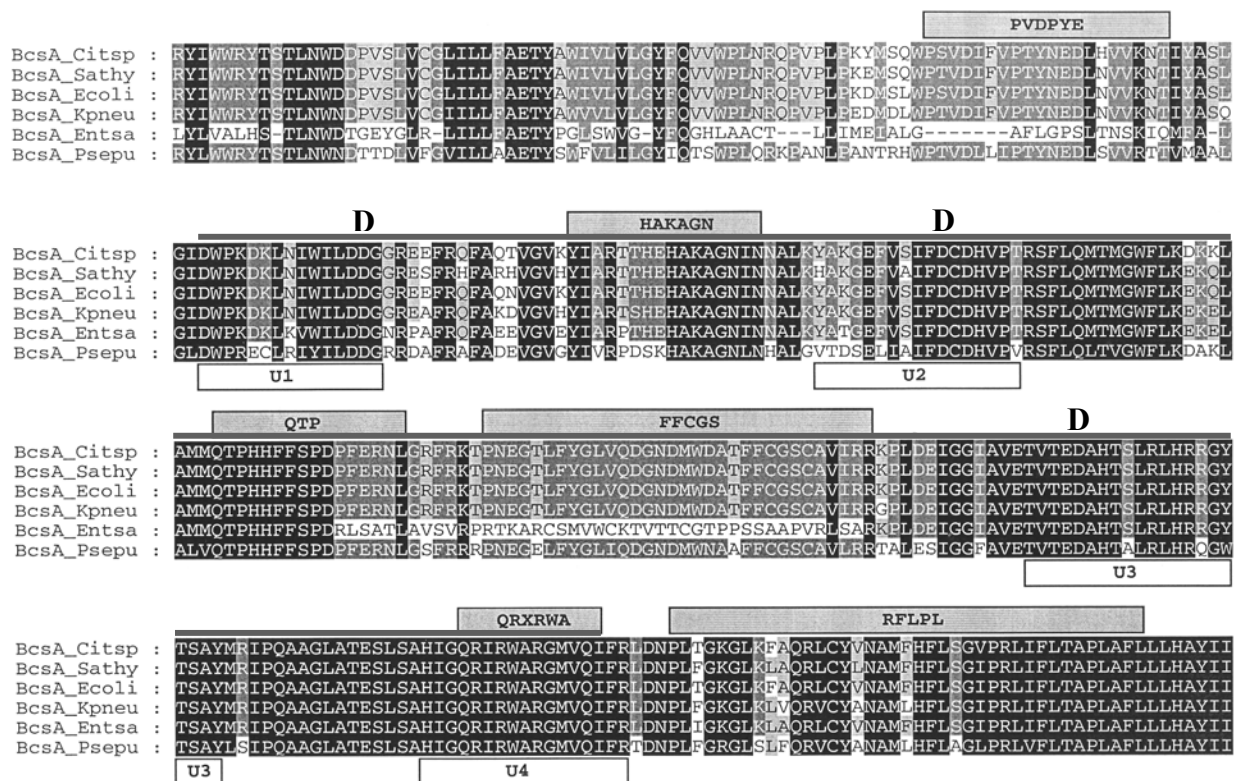


Abb. 49. Analyse des mittleren Bereiches des BcsA Proteins. *S. Typhimurium* 212-556 As; *E. coli* 212-556 As; *Citrobacter spp.* 212-556 As; *E. sakazakii* 215-545 As; *K. pneumoniae* 212-556 As; *P. putida* 112-455 As. Weitere Erklärungen s. Text.

III.6. Analyse des Proteins BcsZ

Das Cellulase Protein BcsZ von *S. Typhimurium* ist eine Endo-1-4- β -Glukanase der Cellulase Familie 8. Die Klassifikation der Glykosylhydrolasen in Familien (ca. 60) basiert auf der Sequenz Homologie zwischen unterschiedlichen Glykosylhydrolasen bei verschiedenen Bakterienarten [Expasy.hcuge.ch/cgi-bin/lists?glycosid.txt]. Die Familie 8 der Cellulasen enthält hauptsächlich die bakteriellen Endoglukanasen.

BcsZ ist ein 41,7 kDa (369 As) großes Protein, welches von dem im Cellulose Operon integrierten *bcsZ*-Gen kodiert wird. BcsZ ist erforderlich für die Cellulose Biosynthese, denn eine *bcsZ* Mutante zeigte den Cellulose negativen bdar Morphotyp (s. Abb. 27.). Auch in anderen Cellulose produzierenden Bakterienarten wurde eine Beteiligung des Cellulase Proteins an der Cellulose Biosynthese nachgewiesen [Matthysse *et al.* 1995a, Ausmees *et al.* 1999, Koo *et al.* 1998].

Die Lokalisation des Cellulase Proteins BcsZ in Bakterienzellen ist nicht aufgeklärt. Die Hypothese, dass BcsZ in *S. Typhimurium* in der inneren Membran verankert ist (s. Kap. III.2.4.), muss noch überprüft werden. Eine Computeranalyse des BcsZ Proteins identifizierte drei Transmembrandomänen (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/tmp/toppred>). Die erste (6–26 As)- und die dritte (290–310 As)- Domäne sind als sichere Transmembrandomänen eingestuft, während die zweite Domäne (153–173) als putative Transmembrandomäne beschrieben wurde (s. Abb. 50.).

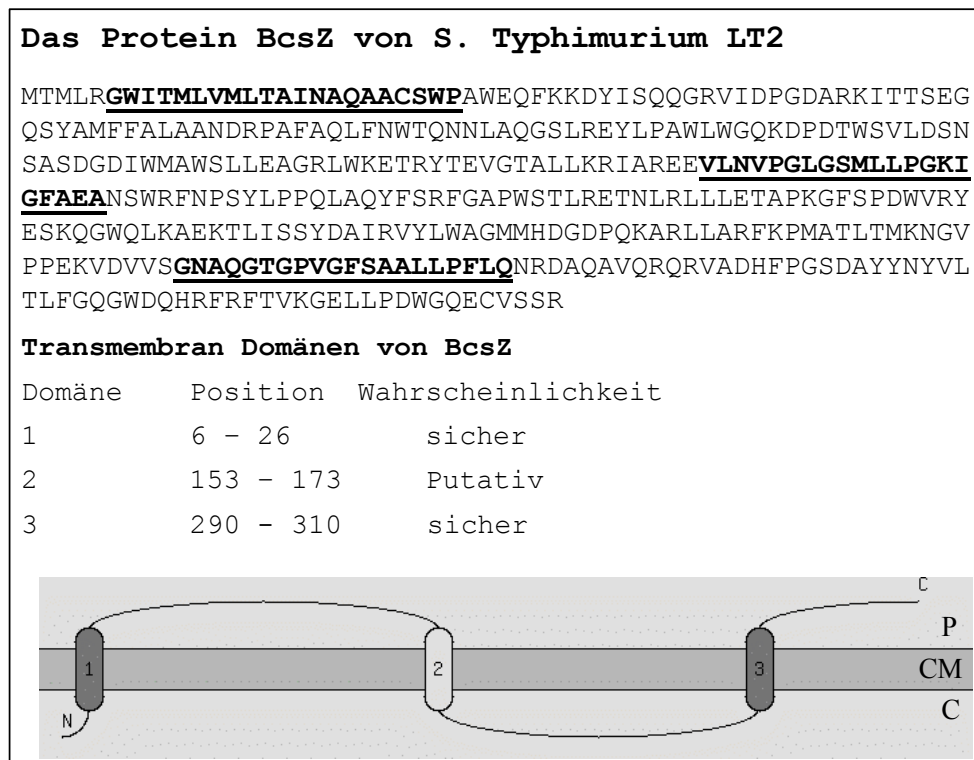


Abb. 50. Das BcsZ Protein von *S. Typhimurium* LT2. C (Cytoplasma), CM (Cytoplasmamembran), P (Periplasma). Weitere Erklärungen s. Text.

III.7. Analyse des CsgA Proteins

Das CsgA Protein ist die Untereinheit der Curli-Fimbrien. Der Gewinn von CsgA Monomeren wird erst dann erreicht, wenn die Curli-Fimbrien mit 90 % Ameisensäure behandelt werden [Collinson *et al.* 1991]. Das polymerisierte CsgA Protein ist 17 kDa groß und enthält zwei Domänen: eine N-terminale, Proteinase K sensitive Domäne und

eine C-terminale, Proteinase K resistente Domäne. Die C-terminale Domäne enthält fünf Sequenzmotive, die als Tandem angeordnet sind (Konsensussequenz SX₅QXGX₂NXAX₃Q; s. Abb. 50.) [Collinson *et al.* 1999]. CsgA kann eine Reihe von Humanproteinen binden wie z.B. Fibrinogen, Plasminogen, Laminin und Fibronectin [Olsen *et al.* 1989, 2002; Arnqvist *et al.* 1992, Sjobring *et al.* 1994, Ben Nasr *et al.* 1996].

Abb. 51. zeigt das Alignment des CsgA Proteins von *S. Typhimurium* MAE52, *Citrobacter spp.* Fec2, *C. freundii* Fec4; *E. coli* K12 und *E. sakazakii* Fec39. Die Homologie des CsgA Proteins der analysierten Stämme zu CsgA von *S. Typhimurium* beträgt 92 % für Fec2, 90 % für Fec4, 87 % für *E.coli* und 82 % für Fec39.

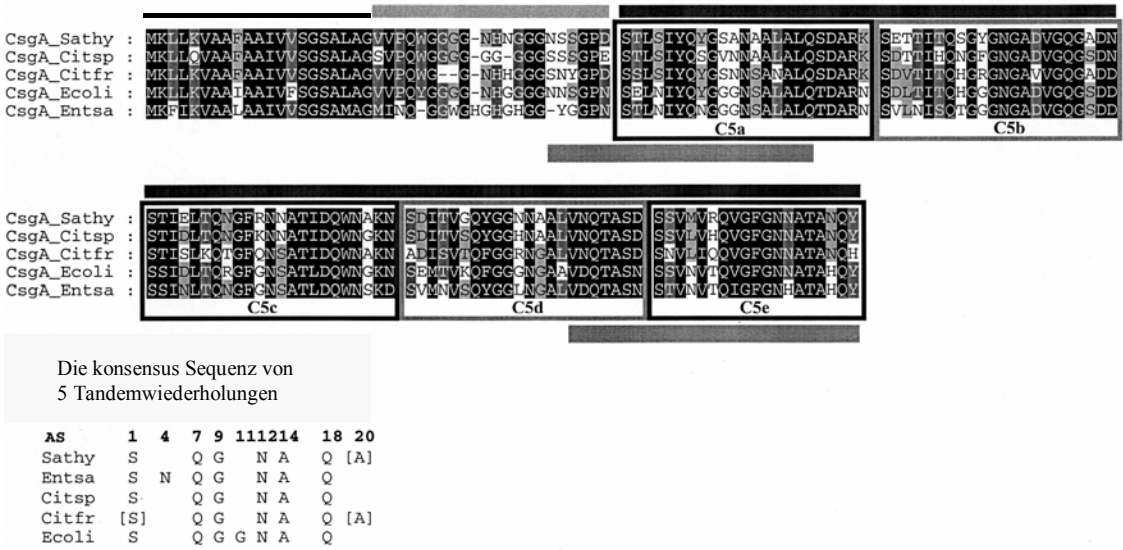


Abb. 51. Alignment des CsgA Proteins. *S. Typhimurium* (Sathy); *Citrobacter spp.* (Citsp); *C. freundii* (Citfr); *E. coli* (Ecoli); *E. sakazakii* (Entsa). Die Linie über den Alignment zeigt das Signalpeptid; der graue Balke zeigt die Proteinase K sensitive Domäne; der schwarze Balke zeigt die Poteinase K resistente Domäne; C5a - C5e Kästchen zeigen die Tandem-Anordnung der Sequenzmotive; die Balken unter der Sequenz zeigen die Humanprotein bindenden Motive.

III.8. Analyse der *csg*-intergenischen Region

Die Curli-Fimbrien Biosynthese wird von zwei Operons reguliert *csgDEFG* und *csgBAC*, welche in *S. Typhimurium* durch eine intergenische Region (IR) von 521 bp. getrennt sind (s. Abb. 52.). In der IR binden regulatorische Proteine, die die transkriptionelle Aktivität des *csgD* Genes beeinflussen [Gerstel *et al.* 2003]. Das Gen *csgD* kodiert für einen Transkriptionsregulator der LuxR Familie, der die Curli-Fimbrien und die Cellulose Biosynthese reguliert. Abb. 52. zeigt das Alignment der IR von *S. Typhimurium* MAE52, *Citrobacter spp.* Fec2, *C. freundii* Fec4, *E. coli* K12 und *E. sakazakii* Fec39. In diesem Alignment sind die Promotor Regionen von *csgB* und

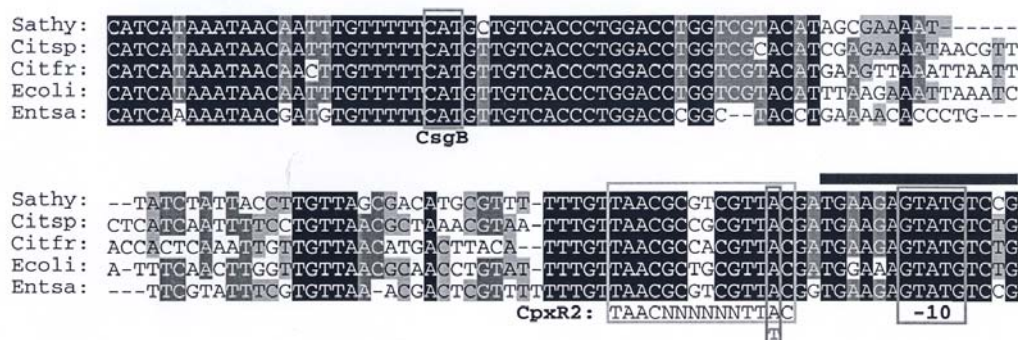
csgD, die intergenischen Regionen IR1 bis IR4 sowie OmpR-, CpxR- und IHF-Bindungsstellen dargestellt.

Die Promotor Regionen sind bei allen fünf getesteten Stämme konserviert. Die IR wurde in vier Bereiche unterteilt IR1 - IR4. Die Einteilung basiert auf den unterschiedlichen GC-Gehalten der Bereiche [Römling *et al.* 1998a]. Während IR1, IR2 und IR4 sehr konserviert sind, ist die IR3 weniger konserviert.

Die Bindungsstellen von IHF (integration host factor) und OmpR (outer mrmbrane protein R) befinden sich nicht nur in den stark konservierten Regionen zwischen den Stämmen. Dies könnte bedeuten, dass die Bindung von IHF und OmpR in verschiedenen Bakterienstämmen bei unterschiedlichen Bedingungen erfolgen.

Das OmpR Protein ist essentiell für die *csgD* Expression. Bei einer *ompR* Mutante bleibt das *csgD* ausgeschaltet und dadurch auch der *rdar* Morphotyp (Curli-Fimbrien und Cellulose produzierend) [Römling *et al.* 1998b, 2000; Prigent-Combaret 2001, Gerstel und Römling 2001]. Abb. 52. zeigt OmpR Bindungsstellen stromaufwärts des *csgD* Promotors. Weitere Bindungsstellen von OmpR wurden kürzlich in dem Übergangsbereich IR2/IR3 sowie in der IR4 nachgewiesen [Gerstel und Römling 2003]. Für das Protein CpxR wurden zwei Bindungsstellen in *E. coli* nachgewiesen [Pringent-Combaret 2002] Konservierte Sequenzen finden sich auch in den hier getesteten Stämmen (s. Abb. 52.). CpxR zusammen mit CpxA bilden ein Zweikomponenten Signaltransduktions-System, das in der Regulation von CsgD in *E. coli* beteiligt ist [Dorel *et al.* 1999]. In *S. Typhimurium* konnte eine Beteiligung des CpxR/CpxA-Systems an der Regulation des *rdar* Morphotypes nicht nachgewiesen werden [Gerstel und Römling 2003, Gerstel 2004].

Die Bindung von IHF in der IR3 aktiviert die *csgD* Expression [Gerstel *et al.* 2003]. Eine IHF Mutante in MAE52 zeigte eine reduzierte Expression des *rdar* Morphotypes auf CR-Agarplatten sowohl bei 28°C als und bei 37°C. Eine IHF Mutante in UMR1 zeigte bei beiden Temperaturen keine *rdar* Morphotyp Expression. Somit trägt IHF nicht zur temperaturabhängigen Regulation des *rdar* Morphotypes bei [Gerstel 2004].



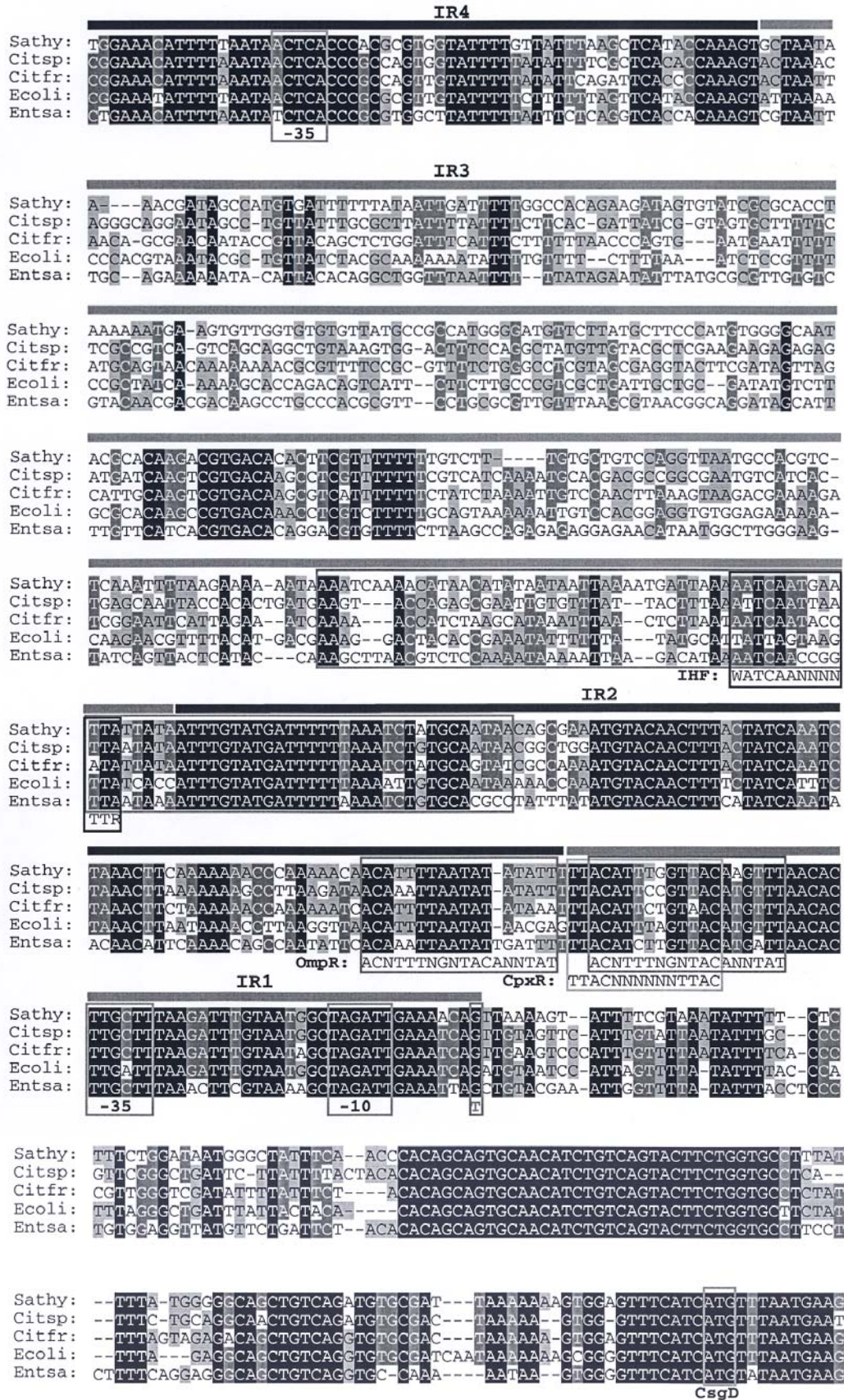


Abb. 52. Alignment der *csg*-intergenischen Region. Weitere Erklärungen s. Text.

IV. Diskussion

In dieser Arbeit konnte Cellulose als eine der extrazellulären Matrixkomponenten bei *S. Typhimurium* und bei einigen Fäkalisolaten der Familie Enterobacteriaceae identifiziert werden. Die Cellulose produzierenden Stämme zeigten auf CR-Agarplatten den rdar- oder pdar Morphotyp. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass an der Bildung des rdar Morphotypes auch die Curli-Fimbrien beteiligt sind [Olsen *et al.* 1989, Römling *et al.* 1998a]. Durch Herstellung von Doppelmutanten (Cellulose- und Curli-Fimbrien negativ, s. Kap. III.1.6.) konnte festgestellt werden, dass der rdar Morphotyp allein aus zwei Komponenten besteht, also aus der identifizierten Cellulose und aus den Curli-Fimbrien. In Abb. 53. ist die genetische Regulationskaskade der Biosynthese des rdar Morphotypes schematisch dargestellt.

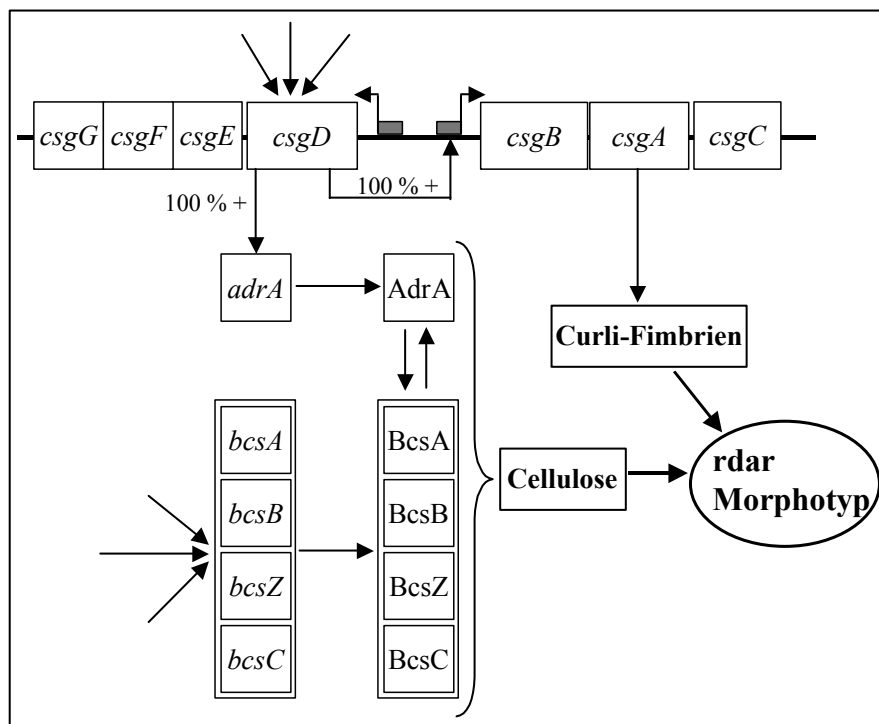


Abb. 53. Regulationskaskade zur Bildung des rdar Morphotypes. Die Pfeile in Richtung *csgD* und *bcsABZC* zeigen, dass andere Faktoren wie z.B. Proteine oder Umweltfaktoren deren Expression beeinflussen können. Weitere Erklärungen s. Text.

Die Expression des rdar Morphotyps wird in *S. Typhimurium* von CsgD reguliert [Römling *et al.* 1998b]. CsgD reguliert direkt die Expression der beiden Curli-Fimbrien (*csgDEFG* und *csgBAC*) Operons [Hammer *et al.* 1995, Römling *et al.* 1998a], während die Cellulose Biosynthese über das *adrA* Gen reguliert wird [Römling 2002]. Während dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CsgD in dem Fäkalisolat *E. coli* Tob1 dieselbe Regulationsfunktion hat, denn eine Mutante mit einer Mutation im *csgD* Gen

exprimierte ebenfalls den saw Morphotyp, welcher kein multizelluläres Verhalten zeigt (s. Abb. 38.). Während die putative CsgD Bindungsstelle für den *csgBA* Promotor in Position -35 bp zum *csgBA* Transkriptionsstart liegt, befindet sich die putative CsgD Bindungsstelle für *adrA* in Position -70 bp zum *adrA* Transkriptionsstart und liegt als invertierte Sequenz vor. Somit scheint die Regulation der Gene *csgA* und *adrA* über zwei unterschiedliche Mechanismen abzulaufen [Brombacher *et al.* 2003]. Das *csgD* Gen wird wiederum von einer Reihe von Regulator Proteinen reguliert, wie z.B. RpoS [Hammer *et al.* 1995, Römling *et al.* 1998a], OmpR [Römling *et al.* 1998a], CpxR [Dorel *et al.* 1999, Pringenet-Combaret *et al.* 2001], IHF und HNS [Gerstel *et al.* 2003]. Wie bereits erwähnt reguliert AdrA die Cellulose Biosynthese nicht über die Transkription von *bcsA* und *bcsC*. Dies konnte indirekt durch Messung der Transkriptionsraten der Gene *bcsA* und *bcsC* in einer *csgD* Mutante, verglichen zum Wildtyp, über die β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen festgestellt werden.

Im Laufe dieser Arbeit wurden auch einige Fäkalisolate anderer Gattungen der Enterobakterien auf Expression des multizellularen Morphotyps und auf Cellulose- und Curli-Fimbrien Produktion untersucht. Die *Citrobacter* Spezies (Fec4 und Fec2) zeigten bei 28°C den rdar und bei 37°C den pdar Morphotyp. Die *Enterobacter* Spezies zeigten generell den pdar Morphotyp bei 28°C und bei 37°C. Die übrigen untersuchten Fäkalisolate zeigten einen Morphotyp, der keine Hinweise auf Cellulose oder Curli-Fimbrien Expression lieferte (s. Kap. III.4.1.). Im Allgemeinen korrelierte die Expression des Morphotypes auf CR-Agarplatten mit der Cellulose und Curli-Fimbrien Bildung. So z.B. beim *C. freundii* Fec4, wo in dieser Arbeit Cellulose und Curli-Fimbrien nachgewiesen werden konnten, d.h. beide Komponenten des rdar Morphotypes. Bei *Citrobacter spp.* Fec2 konnte der bdar Morphotyp,- nicht aber der Cellulose produzierende Morphotyp festgestellt werden. Entsprechend konnten in diesem Stamm die Curli-Fimbrien identifiziert werden nicht aber die Cellulose. Nach einigen Monaten Lagerung bei -80°C zeigte der Stamm Fec2 jedoch eine Morphotypen-änderung. Bei 28°C zeigte der Fec2 den rdar Morphotyp, während bei 37°C der pdar Morphotyp exprimiert wurde. *Citrobacter spp.* Fec2 konnte somit den Farbstoff Calcoflour binden und fluoreszierte auf CF-Agarplatten (s. Abb. 39.). Bei *E. sakazakii* Fec39 konnte nur die Cellulose, nicht aber die Curli-Fimbrien nachgewiesen werden. Dies korreliert mit dem Cellulose produzierenden pdar Morphotyp. Es wurde schon früher berichtet, dass die klinischen Isolate von *E. sakazakii* eine lederartige Morphologie zeigen [Farmer *et al.* 1980]. Basierend auf Ergebnissen dieser Arbeit

kommt die beschriebene lederartige Morphologie aufgrund der Cellulose Produktion zustande.

Auch Verschiedene Umweltbedingungen regulieren die Expression des rdar Morphotypes [Römling *et al.* 1998a, Gerstel und Römling 2001, Gerstel und Römling 2003]. *S. Typhimurium* wie auch *E. coli* Tob1 exprimieren den rdar Morphotyp optimal unter mikroaerophilen Bedingungen, folglich ist unter diesen Bedingungen die höchste Biofilmbildung zu betrachten (s. Kap. II.8.7.5.). Dies galt jedoch nicht für die getesteten Fäkalisolate *C. freundii* Fec4 und *E. sakazakii* Fec39. Aus Experimenten dieser Arbeit ging hervor, dass beide Stämme einen höheren Sauerstoffgehalt in der Kultur für optimale Biofilmbildung, gleichzusätzen mit Cellulose und/oder Curli-Fimbrien Expression brauchten als *S. Typhimurium* oder *E. coli* Tob1. Zwischen diesen beiden Stämmen war der optimale Sauerstoffgehalt für eine maximale Biofilmbildung unterschiedlich. Während bei Fec4 die höchste Biofilmbildung bei 180 upm beobachtet werden konnte, wurde die bei Fec39 bei 210 upm erzielt.

Die Osmolarität oder der Mangel an Eisen sind zwei andere wichtige Umweltfaktoren, die die Expression des rdar Morphotypes beeinflussen können [Römling *et al.* 1998b, Prignet-Combaret *et al.* 2001, Gerstel und Römling 2003] und dieser wird in der stationären Phase, nicht aber in der logarithmischen Phase exprimiert [Römling *et al.* 1998a, Gerstel *et al.* 2001].

Unsere Experimente im Hinblick auf die Expression des Cellulose Synthase Genes *bcsA* zeigten ebenfalls eine Abhängigkeit der Transkription von *bcsA* von verschiedenen Umweltbedingungen. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Expression von *bcsA* nicht vollständig mit der Expression des rdar Morphotypes korrelierte. Der rdar Morphotyp wird nicht in der logarithmischen Phase, bei hoher Osmolarität (0,5 M NaCl) oder durch Zugabe von Glukose (0,4 %) zum LB (ohne Salz) Medium exprimiert [Römling *et al.* 1998a; Gerstel *et al.* 2001], während das *bcsA* Gen unter diesen Bedingungen exprimiert wird,- wenn auch die Transkriptionsrate niedriger ist.

Der Energieverlust zur Bildung des rdar Morphotypes für Bakterien muss hoch sein, insbesondere im Hinblick darauf, dass der rdar Morphotyp in der stationären Phase gebildet wird, d.h. wenn der Nährstoffgehalt im Medium abnimmt. Die Bildung des rdar Morphotypes scheint jedoch für die Bakterien von großer Bedeutung zu sein, denn die extrazelluläre Matrix könnte den Bakterien einen Überlebensmechanismus bieten.

IV.1. Cellulose Nachweis

Die während meiner Diplomarbeit durch Transposonmutagenese hergestellten Mutanten MAE150 und MAE155 zeigten auf CR-Agarplatten den bdar Morphotyp. Der bdar Morphotyp exprimiert die Curli-Fimbrien, nicht aber die, bis zur diese Arbeit unbekannte extazelluläre Substanz (Cellulose) des rdar Morphotypes. Eine bdar Mutante war schon vorher in *S. Typhimurium* erhalten worden [Römling *et al.* 2000]. In dieser Mutante war das Gen *adrA* ausgeschaltet, das an der Biosynthese einer unbekannten Substanz (Cellulose) beteiligt sein musste. Die Analyse des AdrA Proteins zeigte, dass dieses eine Regulatorfunktion hat [Römling *et al.* 2000, Bokranz 2003], somit konnten damals aus der *adrA*-Mutante keine Hinweise über die Natur der unbekannten extrazellulären Substanz geliefert werden.

Die in meiner Diplomarbeit hergestellten bdar Mutanten tragen das MudJ-Transposon in den Genen *yhjO* in MAE150 und *yhjL* in MAE155. Die Produkte dieser Gene wurden dann während dieser Arbeit mit veröffentlichten Proteinsequenzen verschiedener Bakterienarten verglichen und es konnten dabei Homologien in der Cellulose Biosynthese beteiligten Proteinen bei *G. xylinus*, *A. tumefaciens* und *R. leguminosarum* *bv. Trifolii* festgestellt werden (s. Tab. 7.). Da durch dieser Computeranalyse festgestellt werden konnte, dass die genetische Information zur Cellulose Biosynthese bei *S. Typhimurium* vorhanden ist, wurde von der Hypothese ausgegangen, dass dieses Bakterium Cellulose auch produzieren könnte. Die später auf biochemischer und mikrobiologischer Ebene durchgeführten Experimenten zeigten, dass Cellulose die unbekannte extrazelluläre Matrixkomponente des rdar Morphotypes ist. Daher sind die Gene *yhjO*, *yhjL* und die dazwischen liegenden Gene *yhjM* und *yhjN* in *bcsA* (*yhjO*), *bcsB* (*yhjM*), *bcsZ* (*yhjN*) und *bcsC* (*yhjL*) umbenannt worden. ***bcs*** steht für "**b**acterial **c**ellulose **s**ynthesis".

Zum Nachweis der Cellulose wurden zunächst die Morphotypen rdar und pdar von *S. Typhimurium* ausgesucht. Nach Etablierung der Methoden zum Cellulose Nachweis, wurden auch andere Vertreter der Familie Enterobacteriaceae auf Cellulose Produktion untersucht. Zum Nachweis der Cellulose wurde in dieser Arbeit eine hierarchische Reihenfolge der Experimente angewendet. Erst wurden die *S. Typhimurium* Mutanten (und später die Fäkalisolate der Enterobakterien) auf phänotypischer Basis hinsichtlich ihrer Cellulose Produktion untersucht. Dazu wurden sie auf CR- oder CF-Agarplatten ausgestrichen und auf Bindung des Farbstoffes getestet (s. Abb. 2., Abb. 38. und Abb. 39.). Zeigten die Bakterien auf CR-Agarplatten den rdar oder pdar Morphotyp und fluoreszierten zudem auf CF-Agarplatten, dann wurden sie als Cellulose produzierend

eingestuft und in weiteren Experimenten untersucht. Die Ausbreitung der Bakterien auf der Agaroberfläche war ebenfalls ein Indiz für Cellulose Produktion. Die Rolle der Cellulose bei der Ausbreitung auf einer Oberfläche wurde auch bei *P. fluorescens* beobachtet [Spiers *et. al.* 2003]. Die Bakterienaggregate dieser Stämme wurden dann unter dem Mikroskop analysiert. Unter Verwendung des Farbstoffes CF konnten die Cellulose Fibrillen beim pdar Morphotyp sichtbar gemacht werden, während beim rdar Morphotyp aufgrund der Co-Expression der Cellulose mit Curli-Fimbrien eine stark fluoreszierende Flocke zu sehen war (s. Abb. 20. und Abb. 39.). Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten auch die unterschiedliche Konsistenz zwischen rdar- und pdar-Morphotyp. Die Co-Expression von Cellulose und Curli-Fimbrien führte zur Bildung stark hydrophober Bakterienaggregate (s. Kap. III.1.10.), die bei Verwendung eines Enzyms wie z.B. Cellulase oder Proteinase K nicht aufgelöst werden konnten (s. Kap. III.1.7.). Der Verdau des pdar Morphotypes mit Cellulase führte zur vollständigen Auflösung der Bakterienaggregate, während die Proteinase K Behandlung keinen Effekt an die Bakterienaggregate der selben Morphotypes hatte. Die Bakterienaggregate des bdar Morphotypes wurden vollständig aufgelöst, wenn sie mit Proteinase K verdaut wurden, jedoch nicht bei einer Cellulase Behandlung. Durch EM-Untersuchungen konnte die Struktur der unterschiedlichen Morphotypen analysiert werden. Dabei konnte die Bedeutung der Cellulose bei der Bildung des rdar Morphotypes belegt werden, denn bei der Cellulose Mutanten war die honigwabenartige Struktur des rdar Morphotypes geändert. Die EM-Aufnahmen der isolierten Cellulose zeigten diese als eine astförmige Struktur (s. Abb. 23.). Wurden diese Proben mit Cellulase behandelt, war die Cellulose abgebaut und somit auch nicht mittels EM nachzuweisen.

Die Detektion der Glukose bei GC/MS war dann die Abschlussanalyse, die zur Cellulose Detektion bei *S. Typhimurium* und anderen Enterobakterien während diese Arbeit verwendet wurde. Für den GC/MS wurden die Proben durch Behandlung der Bakterienaggregate mit heißen Säuren nach der Updegraff-Methode aufbereitet [Updegraff 1969]. Dabei bleibt nur kristalline Cellulose als einziges Kohlenhydrat zurück. Bei den Cellulose produzierenden Morphotypen rdar und pdar der *S. Typhimurium* oder anderen getesteten Enterobakterien wurde Glukose detektiert, nicht jedoch bei den bdar- und saw Morphotypen.

Um auszuschließen, dass die detektierte Glukose doch aus Glykogen stammen könnte, wurden zusätzlich Glykogen Mutanten hergestellt (s. Kap. III.1.9.), die dann für den GC/MS nach der Updegraff-Methode behandelt wurden. Aus diesen Proben wurde Glukose detektiert, was darauf hindeutet, dass die detektierte Glukose aus Cellulose

stammte. Außerdem zeigte die Analyse der Glykogen Mutanten auf CR-Agarplatten, dass Glykogen nicht an der Expression des Morphotypes beteiligt ist. Eine Glykogen Mutante zeigte auf CR-Agarplatte den selben Morphotyp wie ihr Ausgangsstamm (s. Abb. 17.).

Limitationen des Nachweises

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden haben auch ihre Limitationen, die den Cellulose Nachweis erschwerten. So z.B. die Calcoflour Färbung erwies sich als eine gute Methode für eine erste globale Selektionierung von Cellulose produzierenden und Cellulose nicht produzierenden Stämmen, die Färbung bakterieller Aggregate mit Calcoflour ist jedoch kein ausreichender Beweis dafür, dass die getesteten Bakterienstämme auch Cellulose produzieren, denn Calcoflour bindet ausser an Cellulose auch an andere Polysacharide wie z.B. Curdlan.

Die Updegraff-Methode zur Isolierung der Cellulose und die anschließende Analyse der Proben im GC/MS hat ebenso ihre Nachteile. Trotz großer Aufmerksamkeit der Behandlung der Proben kann sie leicht durch glukoseenthaltendes Material verunreinigt werden.

EM-Untersuchungen von isoliertem Material zeigten generell klare Unterschiede zwischen einem Cellulose produzierendem Stamm und einer Cellulose Mutante. Aber auch die EM-Untersuchungen ergaben nicht immer klare Ergebnisse. Die Cellulose Mutante *S. Typhimurium* MAE190 zeigte z.B. eine undefinierbare faserartige Struktur (s. Abb. 22.).

Die Verwendung weiterer Methoden wie z.B. Röntgenstrahlung isolierter Cellulose [Nishiyama *et al.* 2002/2003] oder eine Immunogoldmarkierung des Cellulose Synthase Proteins [Kimura *et al.* 1999] werden voraussichtlich Ergebnisse liefern, die zum anschaulichem Nachweis der Cellulose beitragen können (s. Kap. IV.6.).

IV.1.1. Cellulose Biosynthese bei Enterobakterien

An der Cellulose Biosynthese sind zwei divergent transkribierte Operons *bcsABZC* und *bcsEFG* beteiligt (s. Abb. 25.). Zwischen den beiden Operons liegen die Gene *yhjR* und *yhjQ*. Während über die Funktion des *yhjR* Genes bisher noch nichts bekannt ist, wurde über das Gen *yhjQ* berichtet, dass es in der Zellteilung und die Zellmorphologie der *E. coli*-Bakterien beteiligt ist [Kim *et al.* 2002].

S. Typhimurium und andere getestete Fäkalisolate der Familie Enterobacteriaceae produzieren Cellulose bei der Ausbildung des rdar- und/oder des pdar Morphotypes. Der Morphotyp der Enterobakterien wird von dem Protein CsgD reguliert und damit

unter den hier untersuchten Bedingungen auch die Cellulose Biosynthese. Die Regulation der Cellulose Biosynthese bei CsgD erfolgt indirekt durch die Aktivierung des *adrA* Genes. Das *adrA* Gen ist abhängig von CsgD [Römling *et al.* 2000]. Ein Plasmid exprimiertes *adrA* Gen konnte unabhängig von CsgD die Cellulose Biosynthese induzieren. Somit war klar, dass ein funktionierendes *adrA* Gen alleine für die Induzierung der Cellulose Biosynthese ausreicht [Bokranz 2003]. Auf transkriptioneller Ebene war die Expression von *adrA* nicht von *bcsA* und damit auch nicht von der Cellulose Biosynthese abhängig (s. Kap. III.1.5.). Somit lässt sich vermuten, dass *adrA* und die *bcs* Gene erst auf Protein Ebene miteinander interagieren und die Cellulose Produktion induzieren (s. Abb. 53.).

Das AdrA Protein bildet c-di-GMP, welches die Cellulose Synthase aktiviert [Römling 2002, Ross *et al.* 1997]. Das Cellulose Synthase Protein BcsA ist in der Cytoplasma Membran (CM) lokalisiert [Römling 2002] und nutzt hier UDP-Glukose als Substrat und synthetisiert diese zu Celluloseketten. BcsA enthält ein konserviertes Motif D,D,D35QXXRW, das unerlässlich für die Cellulose Biosynthese ist [Kimura *et al.* 1999, Saxena *et al.* 1994]. Außerdem trägt das BcsA Protein zwei weitere Motife FFCGS und RFLPL, die bei der Curdlan Synthase fehlen [Stasinopoulos *et al.* 1999, Römling 2002]. BcsB ist ebenfalls in der CM lokalisiert und bindet c-di-GMP. BcsZ und BcsC sind ebenfalls an der Cellulose Biosynthese beteiligt, ihre konkrete Rolle ist jedoch noch nicht bekannt [Mathysse *et al.* 1995a, diese Arbeit]. Wahrscheinlich sie sind an der Bildung eines membrangebundenen Protein-Komplexes beteiligt, welcher das extrudieren der Cellulose ermöglicht [Wong *et al.* 1990, Römling 2002]. Die Beteiligung des *bcsEFG* Operons in der Cellulose Biosynthese wurde von Solano *et al.* (2002) beschrieben. Die konkrete Rolle dieser Gene bei der Cellulose Biosynthese ist jedoch noch nicht bekannt [Solano *et al.* 2002].

IV.2. Nachweis der Funktion des bcsZ Proteins

In dieser Arbeit konnte die Funktion des BcsZ Proteins von *S. Typhimurium* als Cellulase (Endo β -1,4-D-Glukanase) identifiziert werden. Hinweise auf eine Cellulase Aktivität des BcsZ Proteins wurden von BcsZ Homologen aus *E. coli* (BcsC) [Park und Yun 1999], *Cellulomonas uda* (CMCase) [Nakamura *et al.* 1986], *Erwinia chrysanthemi* (CelY) [Guisseppi *et al.* 1991], *Gluconacetobacter xylinus* (EngX) [Wong *et al.* 1990] und von *Agrobacter tumefaciens* (CelC) erhalten [Matthysse *et al.* 1995b].

Die Cellulase Aktivität des BcsZ Proteins wurde auf Carboxymethylcellulose- (CMC) Agarplatten und auf CMC-SDS-Polyakrylamidgelen getestet. Endo β -1,4-D-Glukanasen

sind in der Lage CMC abzubauen und infolgedessen erscheint ein gelblicher Hof auf dem rötlichen Hintergrund (s. Abb. 30. und Abb. 31.) [Park und Yun 1999, Park *et al.* 1999]. Die Messung der BcsZ Cellulase Aktivität auf CMC-Agarplatten war nur im genetischen Hintergrund von DH5 α möglich. Hier konnte der CMC-Abbau auf das *bcsZ* Gen (pXZO62A) zurückgeführt werden. *S. Typhimurium* Stämme weisen auch bei Fehlen des *bcsZ* Genes Cellulase Aktivität auf. Dies deutet darauf hin, dass am Abbau der CMC außer BcsZ auch andere mit Cellulase Aktivität sekretierte Proteine beteiligt sein müssen. Durch Transposonmutagenese wurde versucht weitere Gene, die am CMC-Abbau beteiligt sind zu identifizieren. Bisher konnten jedoch noch nicht genügend Klone ausgewertet werden.

Die Lokalisation des Cellulase Proteins, das von einem im Cellulose Operon integrierten Gen kodiert wird, ist in Bakterienzellen noch nicht aufgeklärt. Park und Yun (1999) berichten darüber, dass das BcsC Protein von *E. coli* (Homologes Protein zu BcsZ) bis zu 60 % sekretiert wird. Basierend auf Ergebnissen dieser Arbeit kann dies nicht für das BcsZ Protein von *S. Typhimurium* behauptet werden (s. Kap. III.2.4.).

Durch Behandlung der inakten Bakterienzellen mit Proteinase K wurde das BcsZ Protein nicht degradiert (s. Abb. 32.). Dies bedeutet, dass BcsZ kein Oberflächen Protein sein kann. BcsZ konnte jedoch degradiert werden, wenn die Bakterienzellen permeabilisiert und dann mit Proteinase K behandelt wurden (s. Abb. 33.). Dieses Resultat führt zur Hypothese, dass BcsZ in *S. Typhimurium* in der inneren Membran verankert sein könnte. Dafür spricht auch die Computeranalyse, welche drei Transmembrandomänen vorhersagt (s. Abb. 50.). Für eine genau Lokalisation des BcsZ Proteins können zwei mögliche Methoden Aufschluß liefern. Die erste Methode beruht auf Fraktionierung der Bakterienzellen und der anschließenden Analyse der einzelnen Fraktionen auf Präsenz von BcsZ mittels Western Blots. Die zweite Methode beruht auf der Kopplung des BcsZ mit z.B. einem grün fluoreszierenden Protein. Aus zeitlichen Gründen sind diese Methoden noch nicht durchgeführt worden.

Die *bcsZ* Mutante MAE225A zeigte auf CR-Agarplatten den Cellulose negativen bdar Morphotyp (s. Abb. 27.). Da aber diese Mutante im *bcsZ* Gen noch die Cm-Kassette trägt, kann ein polarer Effekt auf das stromabwärts gelegene Gen *bcsC* nicht ausgeschlossen werden. Daher kann nicht mit Sicherheit behauptet werden, dass das Protein BcsZ direkt an der Cellulose Biosynthese beteiligt ist. Die Beteiligung eines Cellulase Proteins, kodiert von einem im Cellulose Operon integrierten Gen, konnte bei der Cellulose Biosynthese von *A. tumefaciens* nachgewiesen werden [Matthysse *et al.* 1995a].

Die Expression des *bcsZ* Genes ist wachstumsphasenabhängig. Ab einer Bakteriendichte von OD₆₀₀ 1.0 nimmt die Menge des BcsZ Proteins kontinuierlich ab (s. Abb. 29.). Auf diesem Ergebnis basierend kann es so sein, dass die Cellulase in der frühen logarithmischen Wachstumsphase die Induktion der Cellulose Biosynthese unterstützt. Wenn Cellulose synthetisiert wird, wird die Cellulase Produktion eventuell gestoppt, um so einen Abbau von Celluloseketten durch die eigene Cellulase zu verhindern.

IV.3. Phylogenie der Cellulose – woher kommt die genetische Information für Cellulose Biosynthese bei Enterobakterien?

Cellulose ist eine weitverbreitete Substanz. Sie kommt in Pflanzenreich [Mueller und Brown 1980, Emons 1991, Hotchkiss und Brown 1988, Giddings *et al.* 1980], im Tierreich [Kimura und Itoh 1996, Matthysse *et al.* 2004] und bei Mikroorganismen vor [Brown *et al.* 1976, Nobels *et al.* 2001, Grimson *et al.* 1996].

Es dominiert die Hypothese, dass die Verbreitung der genetischen Information für die Cellulose Biosynthese durch horizontalen Gen-Transfer erfolgte. Auf diesen Weg erlangten die Pflanzen die Cellulose Gene vermutlich von Cyanobakterien [Nobels *et al.* 2001]. Urochordates haben die genetische Information zur Cellulose Biosynthese vermutlich auch von Bakterien erhalten, da die Cellulose Synthase bei Urochordates eine höhere Homologie zu bakteriellen Cellulose Synthase aufweist als zu eukariotischen Cellulose Synthasen [Nakaschima *et al.* 2004].

In Abb. 54. ist der phylogenetische Baum der Cellulose Synthase verschiedener Bakterienarten dargestellt.

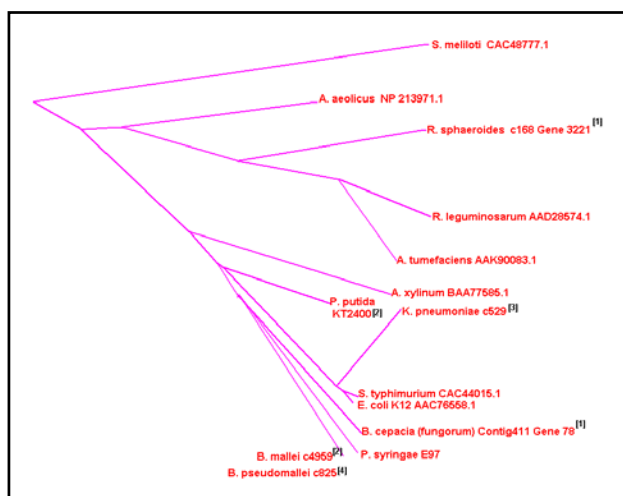


Abb. 54. Phylogenetischer Baum der Cellulose Synthase verschiedener Bakterien. (entnommen aus [http://cell wall.stanford](http://cellwall.stanford)).

Auch innerhalb der Bakterien konnten genetischen Informationen für die Cellulose Produktion via horizontalem Gentransfer übertragen worden sein. Bei *S. Typhimurium*

LT2 liegt der GC Gehalt des *bcsABZC* Operons bei 58 % und somit über dem des restlichen Genoms (51 %). *S. Typhimurium* LT2 könnte die Cellulose Gene aus *P. putida* erhalten haben [Römling 2002]. Dafür spricht die Tatsache, dass eine hohe Homologie zwischen den Cellulose Operons von *S. Typhimurium* und *P. putida* besteht.

IV.4. Curli-Fimbrien

Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, dass *S. Typhimurium* und *E. coli* bei Expression des *rdar*- und *bdar* Morphotypes Curli-Fimbrien bilden [Collinson *et al.* 1996, Römling *et al.* 1998a, 2000, Bian *et al.* 2000; Uhlich *et al.* 2001]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei anderen Enterobakterien die genannten Morphotypen mit der Expression von Curli-Fimbrien korrelieren. Die Curli-Fimbrien wurden in *C. freundii* Fec4 und *Citrobacter spp.* Fec2 nachgewiesen (s. Kap. III.4.2.). Bei einigen anderen Enterobakterien, die keine phänotypischen Hinweise auf Curli-Fimbrien Produktion zeigten, wurde durch Amplifizierung des *csgA* Genes zumindest nachgewiesen, dass die genetische Information für die Curli-Fimbrien Bildung vorhanden ist (s. Kap. III.4.5.). Vielleicht würden diese Stämme unter anderen hier nicht getesteten Umweltbedingungen die Curli-Fimbrien exprimieren. In dieser Arbeit konnte z.B. nachgewiesen werden, dass Fec4 und Fec39 unter verschiedenen Bedingungen unterschiedlich stark Biofilm produzierten. Curli-Fimbrien sind als Komponente der Biofilmbildung nachgewiesen [Römling und Rohde 1999].

Die Funktion der Curli-Fimbrien wurde auf unterschiedlichen Ebenen untersucht. Curli-Fimbrien können z.B. eine Reihe von Humanproteinen binden, wie z.B. Fibrinogen, Plasminogen, Laminin und Fibronectin [Olsen *et al.* 1989, Arnqvist *et al.* 1992, Sjöbring *et al.* 1994, Ben Nasr *et al.* 1996]. Bei *S. enteritidis* und *E. coli* wurde nachgewiesen, dass die Curli-Fimbrien die Invasion auf Epithelzellen vermitteln [Dibb-Fuller *et al.* 1999, Gophna *et al.* 2001]. Die *Citrobacter* species können überdies extraintestinale Infektionen hervorrufen [Hof und Dörries 2002]. Inwieweit Curli-Fimbrien bei *Citrobacter spp.* Fec2 und *C. freundii* Fec4 an der Virulenz beteiligt sind, ist nur aufgrund der Identifizierung der Curli-Fimbrien Expression nicht vorauszusagen. Fec2 und Fec4 wurden aus Fäkalproben gesunder Personen isoliert. Bei einer Curli-Fimbrien Expression im Wirt hätte dies somit keine Krankheitssymptome zur Folge gehabt. Da die Expression der Curli-Fimbrien außerhalb des Menschen nachgewiesen wurden, könnte dieses auch als Anpassung an neue Umweltbedingungen zurückzuführen sein.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Curli-Fimbrien auch an Cellulose binden können. Als Folge einer Co-Expression bilden die Bakterien eine festere hydrophobe extrazelluläre Matrix aus (s. Kap. III.1.10. und III.1.11.).

IV.5. Korrelation zwischen Phylogenie, extrazellulärer Matrix und Lebensstil bei diversen Enterobakterien

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass der *rdar* Morphotyp keinen Einfluß auf die Virulenz von *S. Typhimurium* und *S. enteritidis* hat. [Römling *et al.* 2000, Solano *et al.* 2002]. Während Curli-Fimbrien als eine der *rdar* Matrixkomponenten eine Invasion in Epithelzellen vermitteln können [Dibb-Fuller *et al.* 1999, Allen-Vercoe *et al.* 1999, Rajashekara *et al.* 2000, Gophana *et al.* 2001], wurde für Cellulose bisher noch kein Effekt an Adhärenz oder Invasion in Epithelzellen nachgewiesen [Solano *et al.* 2002].

Abb. 55. zeigt das Verhältnis zwischen Phylogenie, extrazellulärer Matrix und Lebensstil verschiedener Enterobakterien. Analysiert wurde auch *P. putida*, als möglicher Herkunfts-Organismus für die Cellulose Synthase der Enterobakterien.

Phylogenetischer Baum basiert auf 16S RNA von Enterobakterien verwandt zu <i>S. typhimurium</i> und <i>E. coli</i>	Gene			Expression		Lebensstil
	<i>csgA</i>	<i>csgD</i>	<i>bcsA</i>	Curli-Fim.	Cellulose	
// ————— <i>P. putida</i>	+	+	+	-	+	Erde
————— <i>E. cloacae</i>	+	+	+	(+)	(+)	Kommensal
————— <i>K. pneumoniae</i>	-	-	+	-	(+)	(Erde) Opp. Pathogen
————— <i>K. oxytoca</i>	-	-	+	(-)	(-)	(Erde) Opp. Pathogen
————— <i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	Opp. Pathogen
————— <i>R. ornithinolytica</i>	+	-	+	(-)	(-)	Opp. Pathogen
————— <i>E. aerogenes</i>	+	-	+	n.d	(+)	Kommensal
————— <i>S. typhimurium</i>	+	+	+	+	+	Pathogen
————— <i>C. farmeri</i>	+	+	+	(+)	(+)	Opp. Pathogen
————— <i>E. sakazakii</i>	+	+	+	-	+	Kommensal
————— <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	Kommensal
————— <i>S. flexneri</i>	+	+	n.d	-	n.d	Human Pathogen

Abb. 55. Verhältnis zwischen Phylogenie, extrazellulärer Matrix und Lebensstil. Der phylogenetische Baum wurde konstruiert indem die 16S RNA von 33 bis 1453 bp (in Bezug auf *E. coli* Sequenz) zum Analysieren verwendet wurden. Die Präsenz der Gene wurde durch PCR getestet, während die Expression der Cellulose und Curli-Fimbrien durch biochemische Methoden analysiert wurden. Die Angaben über *S. flexneri* wurden von Sakellaris *et al.* 2000 übernommen. (+) oder (-) Expression wurde durch phänotypische Analysen (CR- und CF- Bindung) ausgewertet. (Opp.) Opportunist, (n.d.) nicht bestimmt, (Curli-Fim.) Curli-Fimbrien. Accession Nummern von 16S RNA sind: *P. putida*, AF094741.1; *E. cloacae*, AJ251469.1; *K. pneumoniae*, AF130981; *K.*

oxytoca, AF129440; *C. freundii*, AJ233408.1; *R. ornithinolytica*, AF129441; *E. aerogenes*, AJ251468.1; *S. typhimurium* LT2, NC_003197; *C. farmeri*, AF025371.1; *E. sakazakii*, AB004746.1; *E. coli* K-12, NC_000913; *S. flexneri*, X96963.1

Die Untersuchungen der unterschiedlichen Fäkalisolate haben keinen eindeutigen Hinweis darauf ergeben, inwieweit der *rdar* Morphotyp charakteristisch für Bodenbakterien, Kommensale Organismen, Opportunistisch pathogenen Bakterien oder pathogenen Bakterien spezifisch ist. Wie der Abb. 55. zu entnehmen ist, wird der *rdar* Morphotyp von Enterobakterien unterschiedlichster Herkunft exprimiert: Kommensale (*E. coli*), Opportunisten Pathogene (*C. farmerii*) und Pathogene (*S. Typhimurium*). Die Expression des *rdar* Morphotypes bei *S. Typhimurium* ist temperaturabhängig. Er wird bei 28°C-, nicht aber 37°C exprimiert. Auch bei *Citrobacter spp.* *Fec2* und *C. freundii* *Fec4* war die Expression des *rdar* Morphotypes Temperaturabhängig: beide exprimieren den *rdar* Morphotyp bei 28°C,- nicht aber bei 37°C.

IV.6. Ausblick

Mit der Identifizierung von Cellulose, ist auch die zweite bis zu dieser Arbeit unbekannte extrazelluläre Substanz des *rdar* Morphotypes bei Enterobakterien nachgewiesen worden. Die Cellulose Detektion erfolgte durch Anwendung unterschiedlicher biochemischer, mikrobiologischer und chemischer Methoden.

Eine weitere Methode, die zur Cellulose Detektion verwendet werden könnte ist der Cellulose Nachweis mit Hilfe von CBD (Cellulose Binding Domain). CBD bindet an Cellulose und dies kann mit Hilfe des Anti-His-Tag-Antikörpers nachgewiesen werden [Linder *et al.* 1996, Linder *et al.* 1999].

Ein weiterer wichtiger Ansatz zur Aufklärung der Cellulose Biosynthese bei Enterobakterien wäre der elektronenmikroskopische Nachweis des Cellulose Synthese Komplexes (Terminalen Komplexes (TC)). Pflanzen und einigen Algen zeigen den rosetten TC [Mueller und Brown 1980], während Urokordaten und *G. xylinus* über den linearen TC für die Cellulose Biosynthese verfügen [Brown *et al.* 1976]. Bei Enterobakterien wäre das Auftreten einer neuen Form des TC der Cellulose Biosynthese nicht unbedingt auszuschließen, wenn man bedenkt, dass Enterobakterien einen ganz anderen Lebensstil haben.

Darüberhinaus könnte man die Cellulose Synthase im Cellulose Biosynthese Komplex durch Immunogold Markierung des BcsA Proteins nachweisen [Kimura *et al.* 1999].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das BcsZ Protein in *S. Typhimurium* eine Cellulase Funktion hat und dass dieses Protein an der Cellulose

Biosynthese beteiligt ist. Die Lokalisation des BcsZ Proteins in *S. Typhimurium* ist bis jetzt noch nicht genau geklärt. Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen, kann das BcsZ Protein in *S. Typhimurium* in der inneren Membran verankert sein. Eine eindeutige Lokalisation des BcsZ Proteins könnte genauer durch Fraktionierung der Bakterienzellen oder durch eine Kopplung des BcsZ mit einem grün-fluoreszierendes-Protein nachgewiesen werden.

V. Zusammenfassung

Cellulose ist das am weitesten verbreitete Makromolekül auf der Erde. Obwohl das Bakterium *G. xylinus* für sehr lange Zeit der Modellorganismus für die Cellulose Biosynthese war, waren dennoch nur sehr wenige weitere Bodenbakterien bekannt, die Cellulose produzierten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *S. Typhimurium* und zahlreiche andere Enterobakterien Cellulose produzieren. Cellulose führt unter anderem zu Biofilmbildung und zu Bildung von Bakterienaggregaten. Auf der Basis von Transposonmutationen in den Genen *yhjO* und *yhjL* (im Rahmen dieser Arbeit umbenannt in *bcsA* (bacterial cellulose synthesis gene A) und *bcsC*), konnte sowohl durch phänotypische Charakterisierung als auch mittels chemischer Methoden nachgewiesen werden, dass eine von *S. Typhimurium* produzierte, zuvor noch nicht charakterisierte extrazelluläre Matrixkomponente, Cellulose ist. Erste Hinweise auf eine Cellulose Produktion wurden über die spezifische Bindung von Kongorot sowie Calcoflour auf Agarplatten gewachsener Wildtypkolonien erhalten, die bei den entsprechenden Mutanten nicht vorhanden war. Nach Behandlung von Bakterienzellen mit einem Gemisch aus heisser Essigsäure-Salpetersäure (den Updegraff-Reagens) konnte nach saurer Hydrolyse des Polysaccharides nur das Monomer Glukose über GC/MS nachgewiesen werden. Da das Updegraff-Reagens spezifisch für kristalline Cellulose ist, konnte somit die Identität des Exopolysaccharides aufgeklärt werden. In weiteren chemischen Analysen wurde die 1-4- β -glykosidische Bindung der Cellulose bestätigt.

In ähnlich aufgebauten Versuchen konnte weiter gezeigt werden, dass auch *S. enteritidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter spp.* sowie *E. sakazakii* das Gen für Cellulose Synthase im Chromosom enthalten und überdies auch in der Lage sind Cellulose zu produzieren.

Zudem wird in *S. Typhimurium* eine weitere extrazelluläre Matrixkomponente, die Curli-Fimbrien mit Cellulose co-exprimiert.

Die Co-expression beider Komponenten führt zu einer charakteristischen Koloniemorphologie auf Agarplatten, dem *rdar* Morphotyp. Durch lichtmikroskopische Studien, Hydrophobizitätsmessungen und Enzymverdau konnte gezeigt werden, dass Cellulose mit Curli-Fimbrien interagiert. So waren die durch Calcoflourbindung fluoreszierenden, locker an die Zellen gebundenen Cellulose Fibrillen bei der Co-expression von Curli-Fimbrien eng um die Zelle gewickelt. Die Oberfläche von Kolonien, die Cellulose und Curli-Fimbrien co-exprimierten war wesentlich hydrophober als bei alleiniger Expression der einzelnen Komponenten. Im Gegensatz zu bakteriellen Aggregate, die nur Cellulose produzierten, konnte Cellulase die bakteriellen Aggregate, die Cellulose und Curli-Fimbrien co-exprimierten nicht verdauen. Cellulose und Curli-Fimbrien scheinen die beiden einzigen Komponenten der extrazellulären Matrix des *rdar* Morphotypes von *S. Typhimurium* zu sein, da Mutationen in den Struktur bzw. Biosynthese Genen für Curli-Fimbrien und Cellulose zu einer Mutante ohne Matrixkomponente führt.

Neben *Salmonella spp.* und *E. coli*, konnte das Curli-Fimbrien Biosynthese Operon auch in anderen Enterobakterien nachgewiesen werden. Die Produktion von Curli-Fimbrien wurde bei *Citrobacter spp.* über Isolierung der Curli-Fimbrien und nachfolgender Sequenzanalyse über Q-Tof gezeigt.

Im Cellulose Biosynthese Operon ist eine Cellulase kodiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Cellulase eine endo-1-4- β -Glukanase ist, die in der Lage ist in Agarplatten sowie in SDS-Polyacrylamid Gelen enthaltene Carboxymethylcellulose abzubauen. Eine hergestellte *bcsZ* Mutante war jedoch polar und konnte durch *bcsZ* auf einen Plasmid nicht komplementiert werden. Eine direkte Beteiligung von BcsZ in der Cellulose Biosynthese ist somit noch nachzuweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit eine neue extrazelluläre Matrixkomponente, Cellulose, gefunden wurde, die von *S. Typhimurium* und anderen Enterobakterien produziert wird. Mit der Identifizierung von Cellulose als extrazelluläre Matrixkomponente von Biofilmen werden somit neue Angriffspunkte für die Anti-Biofilm Therapie identifiziert, die in medizinischen Bereich dann eingesetzt werden können um Biofilmbildung zu vermeiden.

VI. Literatur

- Allen-Vercoe**, E., Sayers, A. R. and Woodward, M. J. 1999. Virulence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis aflagellate and afimbriate mutants in a day-old chick model. *Epidemiol. Infect.* 122. 395-402.
- Archibald**, LK., Gaynes, R. P. 1997. Hospital-acquired infections in the United States. The importance of interhospital comparisons. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 11. 245-55.
- Arioli**, T., Peng, L., Betzner, A., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Hofte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J. and Williamson, E. 1998. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science*. 279. 717-720.
- Arnqvist**, A., Olsen, A., Pfeifer, J., Russell, D. G. and Normark, S. 1992. The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. *Mol. Microbiol.* 6. 2443-2452.
- Atalla**, R. H. and VanderHart, D. L. 1984. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science*. 223. 283-285.
- Ausmees**, N., Jonsson, H., Hoglund, S., Ljunggren, H., and Lindberg, M. 1999. Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology*. 145. 1253-1262.
- Baker**, A. A., Helbert, W., Sugiyama, J. and Miles, M. J. 2000. New insight into cellulose structure by atomic force microscopy shows the i(alpha) crystal phase at near-atomic resolution. *Biophys. J.* 79. 1139-1145.
- Ben Nasr**, A., Olsen, A., Sjöbring, U., Müller-Esterl, W. and Björck, L. 1996. Assembly of human contact phase proteins and release of bradikinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 20. 927-935.
- Bernet**, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R. and Seryin, A. L. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*. 35. 483-489.
- Bertram**, S. und Gassen, H. G. 1991. *Gentechnische Methoden*. Gustav Fischer Verlag.
- Bian**, Z., Brauner, A., Li, Y. and Normark, S. 2000. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J. Infect. Dis.* 181. 602-612.
- Blanton**, R. L., Fuller, D., Iranfar, N., Grimson, M. J. and Loomis, W. F. 2000. The cellulose synthase gene of *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97. 2391-2396.
- Bokranz**, W. 2003. Expression von Biofilmkomponenten bei ausgewählten *Salmonella enterica*- und *Escherichia coli*-Wildtypstämmen sowie Untersuchungen zur Funktionalität des *adrA*-Gens innerhalb der Biofilmregulationskaskade bei *Salmonella Typhimurium*. Doktorarbeit.
- Brombacher**, E., Dorel, C., Zehnder, AJ and Landini, P. 2003. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 149. 2847-2857.
- Brown**, M. R. Jr. 2004. Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century?. *J. Polymer Science. Part A: Polymer Chemistry*. 42. 487-495.

- Brown**, R. M. Jr. 1985. Cellulose microfibril assembly and orientation: recent developments. *J. Cell. Sci. Suppl.* 2. 13-32.
- Brown**, R. M. Jr. and Montezinos, D. 1976. Cellulose microfibrils: visualization of biosynthetic and orienting complexes in association with the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73. 143-147.
- Bullas**, L. R. and Ryu, J. I. 1983. *Salmonella* Typhimurium LT2 strains which are r⁻ m⁺ for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification. *J. Bacteriol.* 156. 471-474.
- Chaplin**, M. F. and Kennedy, J.F. 1986. Carbohydrate analysis: A practical approach. IRL Press Oxford.
- Chaplin**, M. F. 1982. A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 32. 336-341.
- Chapman**, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S. and Hultgren, S. J. 2002. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science.* 295. 851-855.
- Coleman**, F. T., Mueschenborn, S., Meluleni, G., Ray, C., Carey, V. J., Vargas, S. O., Cannon, C. L., Ausubel, F. M. and Pier, G. B. 2003. Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100. 1949-1955.
- Collinson**, S. K., Clouthier, S. C., Doran, J. L., Banser, P. A. and Kay, W. W. 1996. *Salmonella enteritidis* *agfBAC* operon encoding thin, aggregative fimbriae. *J. Bacteriol.* 178. 662-667.
- Collinson**, S.K., Doid, P.C., Doran, J.L., Clouthier, S., Trust, T.J., and Kay, W.W. 1991. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *J. Bacteriol.* 175. 4773-4781.
- Collinson**, S. K., Parker, J. M., Hodges, R. S. and Kay, W. W. 1999. Structural predictions of AgfA, the insoluble fimbrial subunit of *Salmonella* thin aggregative fimbriae. *J. Mol. Biol.* 290. 741-756.
- Collinson**, S. K., Emody, L., Muller, K. H., Trust, T. J. and Kay W. W. 1991. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *J. Bacteriol.* 173. 4773-4781.
- Costerton**, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., and Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 435-464.
- Costerton**, J. W. 1995. Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbiol.* 15. 137-140.
- Cutler**, S. and Somerville, C. 1997. Cellulose synthesis: cloning in silico. *Cloning in silico. Curr. Biol.* 7. 108-111.
- Datsenko**, K. A., Wanner, B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K12 using PCR products. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97. 6640-6645.

- Davies**, DG. and Geesey, GG. 1995. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 61. 860-867.
- Dazzo**, F. B., Truchet, G. L., Sherwood, J. E., Hrabak, E. M., Abe, M. and Pankratz, S. H. 1984. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48. 1140–1150.
- De Kievit**, T. R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C. and Iglewski B. H. 2001. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 67. 1865-1873.
- Delmer**, D. P. 1999. Cellulose Biosynthesis: Exciting Times for A Difficult Field of Study. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50. 245-276.
- Desprez**, T., Vernhettes, S., Fagard, M., Refregier, G., Desnos, T., Aletti, E., Py, N., Pelletier, S. and Hofte, H. 2002. Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform CESA6. 128. 482-490.
- Dibb-Fuller**, M. P., Allen-Vercoe, E., Thorns, C. J. and Woodward. M. J. 1999. Fimbria- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology.* 145. 1023–1031.
- Dickinson**, GM. and Bisno, AL. 1993. Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations. *Int. J. Artif. Organs.* 16. 749-754.
- Domingue**, G. J. SR. and Hellstrom WJ. 1998. Prostatitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 11. 604-13.
- Donlan**, R. M. and Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002. 15. 167-193.
- Eberl**, L. 1999. N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 4. 493-506.
- Ek**, R., Gustafsson, C., Nutt, A., Iversen, T. and Nystrom, C. 1998. Cellulose powder from *Cladophora* sp. algae. *J. Mol. Recognit.* 11. 263-265.
- Elliot**, T. S., Moss, H. A., Tebbs, S. E., Wilson, I. C., Bonser, R. S., Graham, T. R., Burke, L. P. and Faroqui, M. H. 1997. Novel approach to investigate a source of microbial contamination of central venous catheters. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16. 210-213.
- Elvers**, K. T., Leeming, K. and Lappin-Scott, H. M. 2002. Binary and mixed population biofilms: Time-lapse image analysis and disinfection with biocides. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29. 331-338.
- Fagard**, M., Desnos, T., Desprez, T., Goubet, F., Refregier, G., Mouille, G., McCann, M., Rayon, C., Vernhettes, S. and Hofte, H. 2000. *Plant. Cell.* 12. 2409-2424.
- Favery**, B., Ryan, E., Foreman, J., Linstead, P., Boudonck, K., Steer, M., Shaw, P. and Dolan, L. 2001. KOJAK encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Genes. Dev.* 15. 79-89.

- Garrett**, E. S., Perlegas, D., and Wozniak, D. 1999. Negative Control of Flagellum Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is Modulated by the Alternative Sigma Factor AlgT (AlgU). *J. of Bacteriology*. 181. 7401-7404.
- Genevaux**, P., Bauda, P., DuBow, MS. and Oudega B. 1999a. Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Arch. Microbiol.* 172. 1-8.
- Genevaux**, P., Bauda, P., DuBow, MS. and Oudega B. 1999b. Identification of Tn10 insertions in the *dsbA* gene affecting *Escherichia coli* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett.* 173. 403-409.
- Gerstel**, U. and Römling, U. 2001. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium. *Environmental Microbiology*. 3. 638-648.
- Gerstel**, U. and Römling, U. 2003. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res. Microbiol.* 154. 659-667.
- Gerstel**, U., Park, C. and Römling, U. 2003. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Mol. Microbiol.* 49. 639-654.
- Gerstel**, U. 2004. Regulation of *csgD* Promotor activity by environmental conditions and DNA binding proteins. Doktorarbeit.
- Giddings**, T. H. Jr., Brower, D. L. Staehelin, L. A. 1980. Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls. *J. Cell. Biol.* 84. 327-339.
- Gophna**, U., Barlev, M., Seijffers, R., Oelschlager, T. A., Hacker, J. and Ron, E. Z. 2001. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 69. 2659-2665.
- Govons**, S., Vinopal, R., Ingraham, J. and Preiss, J. 1969. Isolation of mutants of *E. coli* B altered in their ability to synthesize glycogen. *J. Bacteriol.* 97. 970-972.
- Govons**, S., Vinopal, R., Ingraham. and Preis, J. 1969. Isolation of mutants of *Escherichia coli* B altered in their ability to synthesize glycogen. *J. Bacteriol.* 97. 970-972.
- Grimson**, M. J., Haigler, C. H. and Blanton, R. L. 1996. Cellulose microfibrils, cell motility, and plasma membrane protein organization change in parallel during culmination in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Sci.* 109. 3079-3087.
- Guisseppi**, A., Aymeric, J. L., Cami, B., Barras, F. and Creuzet, N. 1991. Sequence analysis of the cellulase-encoding *celY* gene of *Erwinia chrysanthemi*: a possible case of interspecies gene transfer. *Gene*. 106. 109-114.
- Hammar**, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A., and Normark, S. 1995. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 18. 661-670.
- Hentzer**, M., Teitzel, GM., Balzer, GJ., Heydorn, A., Molin, S., Giskoy, M. and Parsek MR. 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* 183. 5395-5401.

- Inoue**, H., Nojima, H. and Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96. 23-28.
- James**, G. A., Korber, D. R., Caldwell, D. E. and Costerton, J. W. 1995. Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp. *J. Bacteriol.* 177. 907-915.
- Jarvis**, M. 2003. Cellulose stacks up. *Nature*. 426. 611-612.
- Kawagoe**, Y., and Delmer, D. P. 1997. Pathways and genes involved in cellulose biosynthesis. *Genet. Eng. NY*. 19. 63-87.
- Kim**, M. K., Park, S. R., Cho, S. J., Lim, W. J., Ryu, S. K., An, C. L., Hong, S. Y., Park, Y. W., Kahng, G. G., Kim, J. H., Kim, H., Yun, H. D. 2002. The effect of a disrupted *yhjQ* gene on cellular morphology and cell growth in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60. 34-138.
- Kimura**, S. and Itoh, T. 1996. New cellulose synthesizing complexes (terminal complexes) involved in animal cellulose biosynthesis in the tunicate *Metandrocarpa uedai*. *Protoplasma*. 194. 151-163.
- Kimura**, S., Chen, H. P., Saxena, I. M., Brown, R. M. Jr. and Itoh, T. 2001. Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.* 183. 5668-5674.
- Kimura**, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, C. R. and Brown, R. M. Jr. 1999. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *Plant. Cell*. 11. 2075-2086.
- Koo**, H. M., Song, S. H., Pyun, Y. R. Kim, Y. S. 1998. Evidence that a beta-1,4-endoglucanase secreted by *Acetobacter xylinum* plays an essential role for the formation of cellulose fiber. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62. 2257-2259.
- Kresse**, A. U., Dinesh, S. D., Larbig, K. and Römling, U. 2003. Impact of large chromosomal inversions on the adaption and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs. *Mol. Microbiol.* 47. 145-158.
- Lewin**, B. 1998. *Molekularbiologie der Gene*. Spektrum Verlag. Heidelberg-Berlin.
- Liljestrom** P., Laamanen, I. and Palva, E. T. 1988. Structure and expression of the *ompB* operon, the regulatory locus for the outer membrane porin regulon in *Salmonella typhimurium* LT-2. *J. Mol. Biol.* 201. 663-673.
- Lin**, F. C., Brown, R. M. Jr., Drake, R. R. Jr. and Haley, B. E. 1990. Identification of the uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-Glc) binding subunit of cellulose synthase in *Acetobacter xylinum* using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-Glc. *J. Biol. Chem.* 265. 4782-4784.
- Linder**, M., Nevanen, T. and Teeri, T. T. 1999. Design of a pH-dependent cellulose-binding domain. *FEBS. Lett.* 447. 13-16.
- Linder**, M. and Teeri, T. T. 1996. The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93. 12251-12255.

- Loferer**, H., Hammar, M. and Normark, S. 1997. Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. *Mol. Microbiol.* 26. 11-23.
- Luppens**, S. B., Reij, M. W., Van der Heijden, R. W., Rombouts, F. M. and Abee, T. 2002. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68. 4194-4200.
- Lünsdorf**, H., Rohde, M., Hasse, E. und Müller, E. 1997. Elektronenmikroskopischer Kurs für Biologen. Skript.
- Macfarlane**, S. and Macfarlane, G. T. 2003. Bacterial growth on mucosal surfaces and biofilms in the large bowel. M. Wilson and D. Devine. Medical implications of biofilms. Cambridge University Press. Cambridge. England. 262-286.
- Maira-Litran**, T., Allinson, D. G. and Gilbert, P. 2000. An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (mar) and the multidrug efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 45. 789-795.
- Maloy**, S. R., Stewart, V. J. and Taylor, R. K. 1996. Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Matthysse**, A. G., Deschet, K., Williams, M., Marry, M., White, A. R. and Smith, W. C. 2004. A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101. 986-991.
- Matthysse**, A.G., Thomas, D.L., and White, A.R. 1995a. Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 177. 1076-1081.
- Matthysse**, A.G., White, S. and Linghtfoot, R. 1995b. Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 177. 1069-1075.
- McLaughlin-Borlace**, L., Stapleton, F., Matheson, M. and Dart, J. K. 1998. Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis. *J. Appl. Microbiol.* 84. 827-838.
- Miller**, J. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mills**, A.L., and Powelson, D.K. 1996. Bacterial interactions with surfaces in soils. In *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*. Fletcher, M. (ed.). New York: Wiley-Liss, pp. 25-58.
- Mueller**, S. C. and Brown, R. M. Jr. 1980. Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *J. Cell. Biol.* 84. 315-326.
- Nakamura**, K., Misawa, N. and Kitamura, K. 1986. Sequenc of a cellulase gene of *Cellulomonas uda* CB4. *J. Biotechnol.* 4. 247-254.
- Nakashima**, K., Yamada, L., Satou, Y., Azuma, J. and Satoh, N. 2004. The evolutionary origin of animal cellulose synthase. *Dev. Genes. Evol.* 214. 81-88.

- Nicol**, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H. and Hofte, H. 1998. A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in Arabidopsis. *EMBO. J.* 17. 5563-5576.
- Nishiyama**, Y., Langan, P., Chanzy, H. 2002. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* 124. 9074-9082.
- Nishiyama**, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., Langan, P. 2003. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I α from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* 124. 9074-9082.
- Nobles**, D. R., Romanovicz, D. K. and Brown, R. M. Jr. 2001. Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? *Plant. Physiol.* 127. 529-542.
- O'Toole**, G., Kaplan, H. B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54. 49-79.
- Olsen**, A., Jansson, A. and Normark, S. 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature.* 338. 652-655.
- Park**, Y. W. and Yun, H. D. 1999. Cloning of the *Escherichia coli* endo-1,4-D-glucanase gene and identification of its product. *Mol. Gen. Genet.* 261. 236-241.
- Pear**, J. R., Kawagoe, Y., Schreckengost, W. E., Delmer, D. P. Stalker, D. M. 1996. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93. 12637-12642.
- Peng**, L., Hocart, C. H., Redmond, J. W. and Williamson, R. E. 2000. Fractionation of carbohydrates in Arabidopsis root cell walls shows that three radial swelling loci are specifically involved in cellulose production. *Planta.* 211. 406-414.
- Pesci**, E. C. and Iglewski, B. H. 1997. The chain of command in *Pseudomonas quorum* sensing. *Trends Microbiol.* 4. 132-134.
- Potera**, C. 1996. Biofilms invade microbiology. *Science.* 273. 1795-1797.
- Pratt**, L.A. and Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30. 285-293.
- Prigent-Combaret**, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Ljeune, P., Landini, P. and Dorel, C. 2001. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J. Bacteriol.* 183. 7213-7223.
- Pringenet-Combaret**, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P. and Dorel, C. 2001. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J. Bacteriol.* 183. 7213-7223.
- Prouty**, A. M., Schwesinger, W. H. and Gunn, J. S. 2002. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* 70. 2640-2649.
- Prouty**, A.M., Gunn, J.S. 2003. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infect. Immun.* 71. 7154-7158.

- Raad**, I. 1998. Intravascular-catheter-related infections. *Lancet*. 351. 893-898.
- Rajashekara**, G., Munir, S., Alexeyev, M. F., Halvorson, D. A., Wells, C. L. and Nagaraja, K. V. 2000. Pathogenic role of SEF14, SEF17, and SEF21 fimbriae in *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection of chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 66. 1759-1763.
- Richmond**, T. 2000. Higher plant cellulose synthases. *Genome. Biol.* 1. REVIEW. 1. Epub. Review.
- Roberts**, A. W., Roberts, E. M. and Demler, D. P. 2002. Cellulose synthase (CesA) genes in the green alga *Mesotaenium caldarium*. *Eukaryot. Cell.* 1. 847-855.
- Romeo**, T., Kumar, A. and Preiss, J. 1988. Analysis of the *Escherichia coli* glycogen gene cluster suggests that catabolic enzymes are encoded among the biosynthetic genes. *Gene.* 70. 363-376.
- Romeo**, T., Kumar, A. and Preiss, J. 1998. Analysis of the *Escherichia coli* glycogen gene cluster suggests that catabolic enzymes are encoded among the biosynthetic genes. *Gene.* 70. 363-376.
- Ross**, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Ohana, P. and Mayer, R. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature.* 325. 279-281.
- Römling**, U., Bian, Z., Hammer, M., Sierralta, W. D. and Normark, S. 1998a. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J. Bacteriol.* 180: 722-731
- Römling**, U. 2001. Genetic and phenotypic analysis of multicellular behaviour in *Salmonella* Typhimurium. *Methods Enzymol.* 336. 48-59.
- Römling**, U., Rohde, M., Olsen, A., Normark, S. and Reinköstner, J. 2000. *AgfD*, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.* 36. 10-23.
- Römling**, U., Bokranz, W., Gerstel, U., Lünsdorf, H., Nimtz, M., Rabsch, W., Tschäpe, H. and Zogaj, X. 2003. Dissection of the genetic pathway leading to multicellular behaviour in *Salmonella typhimurium* and other Enterobacteriaceae. M. Wilson and D. Devine. Medical implications of biofilms. Cambridge University Press. Cambridge, England. 231-261.
- Römling**, U., and Rohde, M. 1999. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. *FEMS. Microbiol. Lett.* 180. 91-102.
- Römling**, U., Sierralta, W.D., Eriksson, K., and Normark, S. 1998b. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol. Microbiol.* 28. 249-264.
- Römling**, U., Bokranz, W., Rabsch, W., Zogaj, X., Nimtz, M. and Tschäpe, H. 2003. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int. J. Med. Microbiol.* 293. 273-285.
- Römling**, U. 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res. Microbiol.* 153. 205-212.

- Sambrook**, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saxena**, I. M., Kudlicka, K., Okuda, K. and Brown, R. M. Jr. 1994. Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (*acs* operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *J. Bacteriol.* 176. 5735-5752.
- Schlegel**, H. G. 1992. Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage Georg-Thieme-Verlag Stuttgart-New York. Lehrbuch.
- Sheikh**, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A. D. and Nataro, J. P. 2001. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 41. 983-997.
- Shevchenko**, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68. 850-858.
- Singer**, M. und Berg, P. 1992. Gene und Genome. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg-Berlin.
- Singh**, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P. and Welsh, M. J. 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.* 417. 552 – 555.
- Sjobring**, U., Pohl, G. and Olsen, A. 1994. Plasminogen, absorbed by *Escherichia coli* expressing curli or by *Salmonella enteritidis* expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). *Mol. Microbiol.* 14. 443-452.
- Smit**, G., Swart, S., Lugtenberg, B. J. and Kijne, J. W. 1992. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.* 6. 2897-2903.
- Solano**, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C. and Lasa, I. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* 43. 793-808.
- Spiers**, A.J., Kahn, S.G., Bohannon, J., Traysano, M. and Rainey, P.B. 2002. Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and phenotypic bases of wrinkly spreader fitness. *Genetics.* 161. 33-46.
- Sprott**, G. D., Koval, S. F., and Schnaitman C. A. 1994. Cell fractionation, p. 72-103. In *Methods for general and molecular bacteriology* (P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Stasinopoulos**, S. J., Fisher, P. R., Stone, B. A., and Stanisich, V. A. 1999. Detection of two loci involved in (1-3)- β -glucan (curdlan) biosynthesis by *Agrobacterium* sp. ATCC31749, and comparative sequence analysis of the putative curdlan synthase gene. *Glycobiology.* 9. 31-41.
- Süssmuth**, R., Enerspacher, J., Haag, R. und Springer, W. 1987. Biochemisch-Mikrobiologisches Praktikum. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York.
- Taylor**, N. G., Howells, R. M., Huttly, A. K., Vickers, K. and Turner, S. R. 2003. Interactions among three distinct Cesa proteins essential for cellulose synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100. 1450-1455.

- Taylor**, N. G., Scheible, W. R., Cutler, S., Somerville, C. R. and Turner, S. R. 1999. The irregular xylem3 locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. *Plant. Cell.* 11. 769-780.
- Tremoulet**, F., Duche, O., Namane, A., Martinie, B., Labadie, JC. and European *Listeria* genome Consortium. 2002. Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 210. 25-31.
- Uhlich**, G. A., Keen, J. E. and Elder, R. O. 2001. Mutations in the *csgD* promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 67. 2367–2370.
- Updegraff**, U. M. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Biochem.* 32. 420-424.
- Wang**, X., Cnops, G., Vanderhaeghen, R., De Block, S., Van Montagu, M. and Van Lijsebettens, M. 2001. AtCSLD3, a cellulose synthase-like gene important for root hair growth in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 126. 575-586.
- Vatnyoopaisarn**, S., Nazli, A., Dodd, CE., Rees, CE. and Weites WM. 2000. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Appl. Environ. Microbiol.* 66. 860-863.
- Verma**, D. P. and Hong, Z. 2001. Plant callose synthase complexes. *Plant. Mol. Biol.* 47. 693-701.
- Voet**, D., Voet, J. G. *Biochemie* 1994. VCH-Verlag. 2. Auflage. Lehrbuch.
- Vidal**, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M. and Lejeune, P. 1998. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.* 180. 2442-2449.
- Wong**, H. C., Fear, A. L., Calhoon, R. D., Eichinger, G. H., Mayer, R., Amikam, D., Benziman, M., Gelfand, D. H., Meade, K. H. and Emerick, AW. 1990. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87. 8130-8134.
- Zegans**, M. E., Becker, H. I. and O'Toole, G. 2002. The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA Cell. Biol.* 21. 415-420.

VII. Anhang

VII.1. Alingment von Cellulose Operons *bcsABZC* und *bcsGFE*

(DNA-Sequenz aus dem *S. Typhimurium* LT2-Genom von 3793625 bis 3808744 bp. s. Abb. 25)

```
Ecoli: CGC--AAAAATGAATAAACCA-----GTTTCTCTTGCGCAACAGGTGGAGAAAGTCGAATA
Sathy: CGCTGAAACACGGATAAGTTCTGTCGGTAATACCTGCTTTTAGCCATTCTCTGCGCAACAGGCGAATATGTATAGA
                                         Start STM3624A

Ecoli: CGCAGTATGTAAAAATGAGGCAACAGATTCACTGGGGA--GGT CGCGAGGAGGCGCAATTCTACAAAATTGCGCATT
Sathy: CGCAGGATGCTGAACG-AGGGTTTCGGTATCACC GGGACTGGC CGCGAGGAGGCATAATT-TACAGAATTGAGCGGCT

Ecoli: CACTACCAGTCTGGAGTCAGCCCGGATATGAAGTCAACTATTGCAAATAAAGAAATTAAAGCTGGAAGGCATCGCGCA
Sathy: GACTGCCAGCCTC-AGAAATGCTGAATGTATTCTG-----GCAAATAAAGTAATTCGTCTGCGAAGCGCTCACGCA

Ecoli: ATGAGGAAGATTGCCGGGTGCTGACAGTAAAAAGCAATCGTAGAATCAGCGGCAAGCCGGAAGGTTCCGGTGAGGCG
Sathy: GATTGCACGTTAGCGCCGTCGCGGACGGGGATTTTGCGCGTAATATCAGCAGCAAGCCGCGTTTAC-CCGGTGAGGCG

Ecoli: CAATGTTGCGGGGGCTTTATCCCTGCTGGCATTGGTTGCTGGAGAGAGAAAAACCCCGCACGTTG-CAGGTATGCACC
Sathy: CAATGTTGCGGGGGCTTTGATCCCCGCGGGCATAGGTTGCTGGATAGAGAAAAACCCCGCACGTTGACTGGTATAAACC

Ecoli: TGACAACACCACGGGGGCTAATCTTGACTCTAGACCACTCAAGAATAGCCGCGAAACGTTGTCATTACAACACAGGCG
Sathy: TGGCAACCTGACGGGGGCTAA-CTTGAACCCAAACACTTTAAGGATAGCCGCGAACGTTGTCATTGCAACA-AGGCG

Ecoli: GCTATATGACGTTCCGAGAGCTGGGCATGGCCTTCTGGCATGATTTAGCGGCTCCGGTCATTGCTGGCATTCTTGCCA
Sathy: GCTATATGACGCTTACGAGTTGGGCTGGTCTTCTGGCACGATCTGCGAGCGCCGATCATTGCTGGCATTATCGCCA

Ecoli: GTATGATCGTGAAGTGGCTGAACAAGCGGAAGTAACGTGTGATGCGCGCGTCAGGCTGCCGTAATGGCAATTTCGCGC
Sathy: GTGTGATCGTCAACTGGCTACGTGACAGGAAGTAACCGGT--TTTCAGCGTCTGTCCGCCGTAATGGCAACATGCGCC

Ecoli: CGGACCAGGCCGCGAGGGGGGAAACTCTGCGGCCCTTTTTCGTTCTTACTGCGGGTAAGGCACCCAGTCGCGCCGTTCA
Sathy: CGAACCAGGCCGCGAGGGG--AAACTCTGCGGCCCTTTTTCGGT-TTA CTGCGGGTAAGGCACCCAGTCGCGCCGTTCA
                                         Stop bcsG

Ecoli: GGCGAACGTACGGTTTATCCTGGTATTGAATAACTACTGCATTGAGTTCTCGGAGACCGGTGCTGTTTGTGGCAACC
Sathy: GACGAACGTAGGGCTTACCTCTGGTACTGAATACCAACCGCATTAGCGTTTCTGAAACCGGC CGCGTTTTCGCGCAGAT

Ecoli: CACTGGTGAGTTTCTTCCAGTCAACATTTGTCTTCGGTGAATATCTTGCCATCGAGAACCGCAACCACCAGATCGGAGA
Sathy: TGCTGGTCAGCTTGTTCCAGTTCACACTGTCTTCGGTAAAGAGCTTACCGTCCACGCGCGGTACACCAGTTCGGAAA

Ecoli: TAGCCAGGAAGCTGCTCGGTTGTTCCATGACAATCGGTGCCCCCTGATGCGGTGCCCTTCATGCCGAAGAAATTTACCC
Sathy: TCGCCAGGTAGCTGCTCGGCTGATTAATATCAATCGGCGCGGCCCTCATGCGGGGCTTTCATGCCAAAATTTACCGC

Ecoli: CAACCGGGACGTGGTGATAGACGGGCTAGGGATATCACGTAGGCCAGATACCTGCATTCTGTGCGCCCTTCAGCGCGC
Sathy: CCGCGGGGACGTTGGTGATGGAGGGGCTGGGAATATCGCGCAGGCCGTGAGATCTGCATTCTGTGCGCCCTTCAGCGCGC

Ecoli: CGCCGTGTTCCGGTACGACGACTACCATCACTTTACGACCCGATTTCTCAAGTTCAAGTAAAGAAGGCGTCCAGTTTCAT
Sathy: CGCCGTGTTCCGGTACGACGACTACCATCACTTTACGACCCGATTTCTCAAGTTCAAGTAAAGAAGGCGTCCAGTTTCAT

Ecoli: CAAAGAAATTTCTGCGCCCGCGCTTTTGAATCCGCTGTTTTGCTGACCCCGGATAATGGTTGCCGTCTATGCAGTGGAA
Sathy: CGAACAGTTTCTGCGCCCGGATTTTGAATCCGCTGTTTTGCTGACCGCGGGAAGTGGTTGCCATCTGTCAGCGGCA

Ecoli: GCGTGTGTAGAACGTGGCACTACGGCTGTTTTTATCTTTTTCGGTAACGCTCAGCCAGCGGTTAAGACAGCGGTTAT
Sathy: GCAGGTTAAAGAAATCGCGGAGCGGGAATTGGCTTCACGTTCTTCCCCTGTCAACCAGCGGTTACGACCGCCAGAT

Ecoli: CGTCATAAACCGGCGAAACCATCAAGCCAGCAAAATAACCGGCAGATTTGTTTGATCCATCAATTCGCTCTGCATGC
Sathy: CGTCATATACCGGCGAGCCGTCTGAATGACAGCAGGGCGGTTGGCAGGCCGACTGGTTTCATCAGTTCTGCTCTGCATAC

Ecoli: CGCCATTTTTCGCGAACTTCTTTCAAAAAACCGCCGAATCGGCGGTTATGTC CATCATCAGGTGCTGGGTAAAGCCCCA
Sathy: CGCCGTTTTCGCGAACTTCTTTCAAGAACCGCCAAATTCACCGTTATGATCCATCATCAGATGCTGAGTAAAGCCCCA

Ecoli: GTTTCGAAAGGTTATCAAACAGATAGCAGTCGTTATTTGCCGTTGATACAGATTAGTGTGCGAAGTCTGCCGCGAGC
Sathy: GTTTCGCCAGATTATCAAACAGATAACATTCGTTATTTGCTGGTTGATAAAGTCGGGTTATGCGAAGTTGACCAACAGC

Ecoli: TGGCGCGCAGTAACCGGATCGCCGCGGGGCCACTGTAGGAGGTGGCGGAGTTAAAGTTCTTGAACCTCAATATCGAAAT
Sathy: TGGCGCGCAGCAGACGAATGGCCGCGGGGCCGTGTAAAGACGTACCGGAATTAAGTTGTTTAAACAAATGTCAAAGT

Ecoli: GCGACCAAGTGGATCGACATCAACCGCGCGCTTCTATATCCGACCAGGAAAGCGAACAGATGTTAATCACCAGTA
Sathy: GCGACCATAGCGGATCTGACATCAGGCCTGCCGCTTCGACATCCGACCAGGAGAGCGAACAGATATTGATGACCAATA

Ecoli: GTTCAAAATGGCTGAGCATCAGCGGGCAGCGAAGACGGGAAGGTTCGATTTACGTTTCGCTCCCGGTTATAGAAATTAT
Sathy: GGTCAACCGGCTGCGCATCAGCGGAAGTTGCGCGGGGAACGTGCTTTTCCGCTTTTCTCCCGGCTATAGAAAGGTGT

Ecoli: TCAGCCAGGCGTTAAGGTTTCGCGCTGTTGGCGGTGCAATTTGTGCGGGCATATCACCCACTACCGGTGCGCCACCCG
Sathy: TCACCCAGGCGTTACATTTCGCGCTGTTGGCGGTGCGATTTGCGCAGGCATATCGCCGATGACCGGCTTATCGCCG
```

Ecoli: TCGCCGCAACGGTTGCGCTGCGTTACCAACCGTCTTGTACAGTGGTCGTGGTTCTCGCGCTGGCCACAAGGAGA
Sathy: CTGTTCGCGACGGTACGCGCCGCGTTACCGCCAGTTGTCTGTCACCCTATCGGTTGGCTGCGCTGCCGCCACAGCGTAA

Ecoli: AACTTGGTCCCGCCAGGTAAGTACCTTCAGCCATACAGTATGGCAACCACAAAAACCGTAATGCGAATCCATTGTG
Sathy: AAACCGGGCCCGTTAATGTCTAGTACATTCAGCCATACCATGATGGCGACCACAAACACCGTGACCCGAATCCACTGTG

Ecoli: ACAGCAATAACCAGGCCACTAATAAAACAATAATGGCCCAATCATCTGCCAGTTAATAAAGCGTGTGACAAAGGTGCA
Sathy: ATAAAAATAGCCAGGCAACACAGCAGTACGAAGATGGCCCGGATCATTTGCCAGTTAATAAAAACGGGCGATCAGATCGA

Ecoli: TTAAATAATCGGTACTGAACCCCGCCACCTGCGAACCTTGGCTCATTTATGCTTTCCGGGCCAGGCAACAGGTGTCTAT
Sathy: GCAGATAACCGGAGCTGAATTCCGCCACCTGCGTCCCTGGCTCATATGCTTTCCGGGCCGGCAGCCAGGTATCAT

Ecoli: GCCAGAACAAGGCAAGCCGATCGGCAGGGCAATCCAGTGGCGCAACGATGCAGGCTGTAGCGCGGAAGGGGCATCA
Sathy: GCCAGAACAGCGCGAAGCCGACGGGAATGGCAATCCAGTGGCGCAACCGGTGAAGGCATATCTTTGGTATTTGGCATGA

Ecoli: GCAGAAACGCGGCAACACCAAATTCAGGAGCGGATGGAAGTTAAGATATCCCGCCACAAACAGGCCGAACCTTAACCA
Sathy: GCAGAAACGCGCATGAATACCAAATTCAGTAAAGGATGAAAATTCAGATAGCCTGCCACAGCAGGCCAACTTGACCA

Ecoli: GAAAAATAGAAGTTCAGCCGGAAGGCCGCGCCAGTATTGCCAGAGCGAAGAAGGCATGCCGGTATTTTCGGTAAAT
Sathy: GAAAAATAGAAGTTCAGCCGGAAGGCCGCGCCAGTATTGCCAGAGCGGAGAAGGCATTGAAGGAGTTTGAGTATGCT

Ecoli: GAGTCATTTTTTGGTTGCCCTGGCTTTTCCGTGCGGCGTAACGTCCGGCCGGTTTTAACATAACGAGGTTTACGAAA
Sathy: GAGTCATTTTTTGGTTGCCCTGGCTTTTCCGTGCGGCGTAACGTCCGGCCGGTTTTAACATAACGAGGTTTACGAAA
Start *bcsG* SDS
Stop *bcsF*

Ecoli: GAACAAACGTAAGGTCTCGCGAATGCGTCGCAAAAGAGTGC CGCGCCAGATAGCCCAGCGGGAAAAATATCAGTGCAGCA
Sathy: TAGCAGCCGGGTCTGTATCACTGATACCGCGTACGGAATGCGCGCCAGATAGCCCAGCGGAAAGAAAATCAGCGCGCA

Ecoli: AACGACAATAATTTCAATGATATCGCTGATGGTCATCATGATAGCGCTCCACAGCATCATCTAACAGTCGCATGGGT
Sathy: AAAAAGAATAATTTGACGATATCGCTGATGGTCATCATGATAGCGCTCCCGCGGTGTCGTCGAGCAATCGCAGGGGT
Start *bcsF* SDS
Stop *bcsE*

Ecoli: TCTGCTATTTCGTGCGCAGTGGCGACCATCGTGTCTCGGCATTGATGACCGGTTTAGAACTTTGCGTTAAAGGCAGCGGC
Sathy: TCAGGAATACGACGCCAGATGCGGCCATCGTGTTCGGCATTATTTACCGGTTGCGCGGCTTTTGCCAGCGGTAGCGGC

Ecoli: ATGCCCCATTGTTCTGGGCAAGCAAGCGCATCTGCACCAGCTCGGCACTGATTTGATCATCTTCAAACAGACCATA
Sathy: GTTCCCCACAGTTCGCGCGACAATTAAGCGCATCTGCACCAGCTCGGCGCTGATTTGTTTATCTTCGAACCAGACCATA

Ecoli: CGGTTTGAGAAAAATGTCGCCAGTAGGCAATGGGAAAAATATGATTACACGCGGTATCCAGATCGTTAATCCGACAGAAT
Sathy: CGATTAGAGAAAAATATCGCCCGTGGCAAGGGAAAAATATGTTTACACGCGGTATCCAGATCGTTGACCCGCGAGAAT

Ecoli: GAGAGAAACAGCACCAGCGGATTACCGCCAATGGTTCATGATATCGCCGGTACGGTTAGGGCGACACAGCGTCAGGGCT
Sathy: GATAAAAAACAGCACCAGACGGTTGCGCGCATGGTTCATAATATCGCCGGTTCGGTTTGGCCGACATAATGTTAACGCC

Ecoli: TGTTCACACGCGGATACCCGGTACCGGACGTAGGGCAACCAGAACGCCCTTACCGTGGGCGAGGTAATAGACGGTTATTC
Sathy: TGCTCACACCGGAATGCCCGGACCGGCGCGAGCGCACCAGAACGCCCTTACCGTGGGCGGGAGCAGGCTGTTGCTC

Ecoli: ATCATGTTGTTGACGGCATTAACAGAACACATCCACTTCTGGAACCAACGAGTTTGACGGCTGGGTCTATTGACAGC
Sathy: ATCATCGTATGGATGGCATCGCAGAAAGTATCCACGGCTGAACCAACCGCAGTTTCAACGGCTGCGTCATCGACAGT

Ecoli: AAGGTAGTGATATCTTCCGGCACATAGCGACTAAACTTCTGCCCTGACAGCTTTGATCATCGTCAGACAAACGGGAG
Sathy: AGCGTGCTGATGCTTCCGGTACGTAAACGGCTGAAGTCTGCCCTGACAGCTTTCAATAAGCGTCAGCGACGGTGAA

Ecoli: AGTGGCGCATTCCACGGAATAACCATATTTGCACCGCAGGCCAATAACAAACGTTTCATCGGTGGCGCGCAGGCTAGCG
Sathy: AGCGGGCGGTTCCAGGGAATGATCATATTCGCGCCGACGCCAGCAGAGGCGCTCATCGGTGGCGCGCAAACTGGCG

Ecoli: GTATTTTCGCGCAGGAGATTTTCATCGCACTACCGCGCTGGCGACGAGGGTATGAATGCTGCGGGCCAGTGGCTCG
Sathy: ATATTTTCGCGCAGCAATTTTCAGCGCGCTTCCCGCTGGCGCGCAAGTATGAATGCGACGAGCAAGCGGCTCG

Ecoli: ATTTGCGCATTTTGCTGTAAGAGAAAAAGACCACCGTCCGCGCCTGAGCGGTACGGGCTTCATTGAACAGGACTTCGTTA
Sathy: ATTTGCTTGTCTGCTGTAAGCGAAAAAATAATTGTCGCGGCGCTGCGCGTGCCTGAGCAATAGCGCTTCGTTA

Ecoli: TTGTTGAACAGTTGCCAGTGTTCGGATAGCGGGCGGCGACCTTCCAGTACAGCAACATTAATCAGAAATGCGTTTTCG
Sathy: TTGTCGAAAAGCGTCCAGTGTTCGGAGAGCGGGCGGCGGCGCTTCAAGGACGGCGACGTGGCTAAGAATGCGTTTTCG

Ecoli: TCGCTCGGTGGTTGATCTCCGCTCTCTCGCTTTGAACATAATGTCCAGATACCATTTTCTTGCTGAACGCTAAGCTCG
Sathy: TCGCTACCGGCTGTAATGCGCTCTCTCTGATGGGATAGCGTCCACGTTTCGTCTCTGACACAGCAATAACTGC

Ecoli: TGACGGGCGCTGACCCCTTTTTCGTTGCACCAGAAGGCAATATCCAGCAAATGTTGGTCAACCTGAAAAACGCAAACTG
Sathy: TGTCCGGGCGCTGACCCCTTTTTCGTTGCACCAGAAGGCAATATCCAGCAAATGTTGGTCCCTGAAAAACGTAAACTG

Ecoli: GCAAGACCAAAAAAGTGAAACGGTATTCCTCAAGCAACAATGAAAAATGTTTATCGTTATTATTCCGGGATTAATTACC
Sathy: GCGAGCCAAAAAGTGAGCGATACTCGCCATCAACAACGAGGACTGTTTATCGTTATTATTACAAGGTTAATAACC

Ecoli: AAAAGCGAACAATGCTTTAACTGCTCCATTTATTCATTTTATCCAAACCATGAGCGAGCGCGCTCGGCGACGAATGTTT
Sathy: AACCAATGAACAGTGATGAAAACGAGTCCATTTATTCATTTTTCAGCCATTTATGACGCTTCTGACCTTATATTC

Ecoli: TGCCATGCGTTATTTCGCGCAAAACAAGAATAAAAAAGGTAATTATGCGGATCAATTAGAACAACAGCAAAATACACGGGTCAAA
Sathy: CGCCACGTTGTTATTTGCAAAATAAGAATGAAAAAATAATGCGTCGGGTTAACAGAACAAAGCAAATCGTGGGGCAAA

Ecoli: TAGTATAGACCTTTTTTCATGATTTAGCATTTGAAAAATAATTTTATTTTTTCCGGCCCTTGAGAAATCATCTAATTGAAAG
Sathy: GAGTATAGCCCTTTTTCTGAAGCCCGCATGGTAAATAAGCGGATTTCCTCCGACCGTGAGAAATCATCTAATTGTATT

Ecoli: AATTTTCGCCCGATCGCTGTCCATGCTAATGACCGCGACGCTGTGCGGTTTCAGCCCTGGGATGCAATTGTTTGATTTCGCC
Sathy: ACTTTGCCAGGATCGCTTCCATGCGCATGACCGCGACATTTGCAATTCCTCCGTTTGTGACGCAATCGTTTGATTTCACC

Ecoli: AGACTGATAGCATCTTTCATGGCGATCGACGTTAAACCACCAGACGCCGCCCTGCTGGCATATGTCGCAGCTCATCCCAT
Sathy: AGACTGATGTCATCTTGTCTGGCGATCGCGCTTAAACCACCAGACGCCGCCGCTTGGCATATGTCGCAGTTCATCCCAT

Ecoli: AATGATGAGATAACCGATAGAGAATACAGGGTCCACAAATGTCCCTCATGTACCAATTTTGTCTGATTATCAGTTTACTA
Sathy: AATGATGAGATGCCGAGAGAAAATACAGGGTCCACAGTGTCCCTCATGTACCAATTTTAACTGCTTTATCAGTTTACTA
Start *bcsE* SDS

Ecoli: GCGAAAGCTAGAGAAATAAACCTACCATTGAAATTAAACCTTATCAGATTTAGCATGTGAATCAATTTAGAAAGGTCAAC
Sathy: GCGAAAGCACAGAAATAAACCTAACATTTGAAATTAAACAGCGATCAGATTTAGCATGTGAATCAATTTGCCCGGCGAGCA
bcsEFG TS -10 -35

Ecoli: AGACGTTGTGATTTTAGTCTTTTCGTTTTTA- ACTTTTTCTGTTGCGTAACGGAAAGTCAAAAAGTGAGCAAAATCCCG
Sathy: TGCCCTGTAACTCTTGCGCTTTTCATTTTTTACACATTATAAATGATGTCACGGAAAGATGAAAAATGCGCGTTCTCCCG
-35

Ecoli: TTTTTCGCGTAACAATAAACCGGGCGAATGCTCACGTTAGAAATTTGCTCATGAAACGGTACGCTTATTTTAAAGGGAT
Sathy: TATTG-----ACGACGG---GGCGTAATGCTGCCAGTCAGAA-----AT--A-----T---TTAAAGGGAG
-10 *yhjRQ* TS SDS

Ecoli: CAAGCAAAATGAATAACAATGAACCACTACTCTGCTGATCCCGCGATAGGCTATATCTTCAGAAATGATATTCTGG
Sathy: CAACCAAGATGCTATAACAATGAACCTGCGCGCTCAGTCCGATCCAACGTTGGGCTACACTTTTCAAAATGATTTTCTGG
Start *yhjR*

Ecoli: CGTTAAAGCAGGCATTTTCACTGCGCTGATATTGATTATGCCGATATTTCCCAACCGGAACAGTTGGCGCGCGGATTA
Sathy: CATTAAGCCAGGCGTTTTTCACTACCGAAATAAGATTATAACCGATATTTCCCAACCGGAACAGTTGGCGCGCGGATTA

Ecoli: AACGCTGGCCGTTGCTGGCGAGATTGCGCAACAAAACCT---A---GGGATTGGTGAATGGCCCTACTGGGATAGCAGG
Sathy: AAAGATGGCCGCTCCTGGCTGAATTGCGCAACCACTTTCATTAAAGGAAGCCATGAATGGCGATTCTGGGATGCGAGG
Stop *yhjR* SDS

Ecoli: GCGTGCGGGGAGCGCTGGGGACAAACAACCATCACCGCCGCATTAGCCTGGTCATTACAAATGTTGGGAGAAAATGTCC
Sathy: GCGTGCGCGGGCGGGGTGGGAACCAACATCTCTCACCGCAAGCACTCGCTGGGCGTTACAAATCTTAGGGAGAAAATGTCC
Start *yhjQ*

Ecoli: TGGTGGTTCGATGCCTGCCCGGACAACTTCTTTCGCGCTGTCATTTAATGTTGATTTTACCCACCGCTCAGGGCTGGGCGCA
Sathy: TGGTGATTGACGCCAGCCCCGATAAACCCTCTGCGCATATGTCGTTTAAACGTCGACTTCGTTCCATCAGGGCGGTTGGGCGC

Ecoli: GACCGATGCTGGATGGCCAGGACTGGCGTGACGCTGGGTTGCGCTACACCTCGCAGCTCGATTGCTGCTTTTGGTG
Sathy: GATCGTTGCTGACGGCCAGGACTGGCGCGATGCCGATTACGTTATACCTCACAGCTTGATCTACTGCCGTTTGGAC

Ecoli: AGTTATCCATTGAAGAACAAGAAAATCCACAGCACTGGCAAAACCCTGCTGAGCGATATTGCTCCGGCTTACAGCAAC
Sathy: AGCTCACCGCGCAAGAGCGGAAAATCCCGAGTCTGGCAGGAGACGCTGGGAGAGATCGGATCGGCTATCCAGGCGC

Ecoli: TAAAAGCCAGCGGGCGTTACCAGTGGATTTTAATCGACTTACCGCGTGATGCCCTCGCAGATAACCCACAGCTGCTGA
Sathy: TCAAAGCCAGCGGGCGTTATAGCTGGATTTTACTGACTTGCCCTACGGCGCTCACCGCTGACACGGCAACTGGTGA

Ecoli: GTTTGTGCGATCACTCGCTGGCAATCGTCAATGTGGATGCCAACTGCCATATCCGACTGCATCAGCAAGCGCTGCCGG
Sathy: GCTTCTGCGACCATACGCTGGCGATAGCCCGGGTTGACGCTAACTGCCATATTCGCTTTCATCAGCAGGCGTTGCCCTG

Ecoli: ATGGCGCACATATTTGATTAATGACTTCCGTATTGGCAGTCAGCTTCAGGACGATATTTACCAGCTTTGGTTGCAAA
Sathy: CCGGAGCGCATATTTGATCAATGACTTACCGATTGGCAGTCAGTTACAGGACGATCTGTACCAGCTCTGGCTGCAAA

Ecoli: GCCAGCGCCGATTACTGCGGATGCTCATTCATCGTGATGAAGCGATGGCTGAATGCTGGCGGCTAAGCAACGAGTAG
Sathy: GCCAGCGCCGCTTCTGCGCATGCTCATTCATCGTGATGAGCGATGGCGATGGCGTCCGAAACAGCCGTTAG
-35 -10

Ecoli: GTGAATATCGCAGTGATGCGCTGGCGGCTGAAGAGATACTCAGCTGGCGAACTGGTGCCTGTGAAGTACTCCGGGC
Sathy: GCGAATATCGCAGCGATTCTGTAGCCGCGGAAGAGTGTGTAACGCTGGCGAACTGGTGCCTGTGTCATGATCGGGCG
bcsABZ TS

Ecoli: TGAAAACGCCACTCGGGAGTGATCATGAGTATCCTGACCCGGTGCTTGCTTATCCCGCCGGTCAACGCGCGCTTAT
Sathy: ACAAAACGTCGCGCGGGAGCCTGCGATCGAGCGCCCTTCCCGGTGCTGCTTATCCCGCCGGTTAGCGCGCGCTTTCAG
SDS Start *bcsA* Stop *yhjQ*

Ecoli: CGGGCGTTATCGCGATTATCGTCTGTCACGGTGCCTCGCGCTTTACGCGGACGCTCGGCTGTTCTGGATGATCCTGGC
Sathy: CGAGCGCTATCAGGGTTACCGCGCCACGGCGCGCTCGCGCTTTAGCGGACGCTCGGCTGCTGTTGACGATTCTGGC

Ecoli: CTGGATTTTATTTCGGCTCGAGCACCCGCGCTGGCAGCGTATTCGCGCAGAACATAAAAACCTGCTATCCGCATATCAA
Sathy: CTGGATAGTGTTCGGCTTGAGCATCCGCGCTGGCAGCGTATTCGCGCAGGGCATAAAGCGCTTTATCCGCATATTAA

Ecoli: CGCCTCGCGTCCGCGTCCGCTGGACCCGGTCCGTTATCTCATTCAAACATGCTGGTTATTGATCGGTGCATCGCGCAA
Sathy: CGCCGCAACGCCCGCGCCGCTGGACCCGGCCCGTTACCTCATTCAACCCCTCTGGCTGGTGATGATCTCTCGACTAA

Ecoli: AGAAACGCCGAAACCGCGCAGGCGGTCATTTTCAGGCTCTGC AAAATATTTCGTGGACGTTACCATCAATGGATGAACGA
Sathy: AGAACGTATGAACCGCGCTGGCGGTCATTTGCGGCCCTGAAGGACGTTTCGTGGACGTTACCATCAATGGATGGATAC

Ecoli: GCTGCCTGAGCGCGTTAGCCATAAAACACAGCATCTGGATGAGAAAAAGAGCTCGGTCATTTGAGTGC CGGGGCGCG
Sathy: CTTACCGGAACGGGTGCGCCAAAGACAACGCACCTGGAAAAGGAAAAAGAGCTGGGACATCTTAGCAA CGGCGCCCG

Ecoli: GCGGTTGATCCTCGGTATCATCGTACCTTCTCGCTGATTCTGGCGTTAATCTGCGTTACTCAGCCGTTTAACCCGCT
Sathy: GCGTTTATTCTGGCGTTATCGTACCTTTTCACTGATACTGGCGCTATCTGTATTACGAGCCATTTAACCCGCT

Ecoli: GGCGCAGTTTATCTTCTGTATGCTGCTGTGGGGGTA GCGCTGATCTGACGGCGGATGCCGGGGCGCTTCTCGCGCT
Sathy: ATCGCAATTTATCTTCTGTCTGTGTGGGGCGTTGCGCTGTTGTACGACGATATGCCGGGACGCTTTTCCGCGCT

Ecoli: AATGTTGATTGTGCTGTGCTGACCGTTTCTTGCCGTTATATCTGGTGGCGTTACACCTCTACGCTGAAC TGGGACGA
Sathy: GATGCTCATCTGTGCTGTGCTTAACGCTCTCTGTGCTTATATCTGGTGGCGCTATACCTCGACGCTAAAT TGGGACGA

Ecoli: TCCGGTCAGCTGTGTGTGCGGGCTTATTCTGCTCTTCGCTGAAACGTACGCGTGGATTGTGCTGGTGCTCGGCTACTT
Sathy: CCCGGTCAGTCTGTGTGTGCGGGCTGATTCTGCTGTTTGGCGAAACGTACGCTGGATTGTGCTGGTGCTGGGCTACTT

Ecoli: CCAGGTAGTATGGCCGCTGAATCGTCAGCCGGTGCCATTGCGGAAAGATATGTGCGTGTGGCCGTCGGTGGATATCTT
Sathy: CCAGGTGGTGTGGCCGCTTAATCGTCAAACCGGTGCCGTGCGGAAAGAAATGTGCGAGTGGCCGACGGTGGATATTTT

Ecoli: TGTCCCGACTTACAACGAAGATCTCAACGTGGTGAAAAATACCATTACGCTTCGCTCGGTATCGACTGGCCGAAAGA
Sathy: TGTACCGACCTATAACGAAGACCTTAATGTGGTCAAAAATACCATTACGCTTCGCTTGGCATTGACTGGCCGAAGGA

Ecoli: TAAGCTGAATATCTGGATCCTTGATGACGGCGGCGAGGGAAGAGTTTCGCCAGTTTGCGCAAAACGTGGGSGTGAAATA
Sathy: CAAGCTGAATATCTGGATCCTTGATGACGGCGGCGCTGAATCATTTTCGTCATTTTGCGCGACATGTTGGCGTGCAATTA

Ecoli: TATCGCCCGCACCACTCATGAACATGCCAAAGCAGGCAACATCAACAATGCGCTGAAATATGCCAAAGCGAGTTCTGT
Sathy: CATTCGCCCGCACCACTCATGAACACGCCAAAGCCGCAACATCAACAATGCGCTA AAACACGCGAAAGCGAGTTTGT

Ecoli: GTCGATTTCGACTGCGACCACGTACCAACGCGATCGTTCTTGCAAATGACCATGGGCTGGTTTCCTGAAAGAAAAACA
Sathy: GCGGATTCGATTGCGACCATGTGCCGACACGCTCGTTCTTGCAAATGACAATGGGCTGGTTTCCTGAAAGAAAAACA

Ecoli: GCTGGCGATGATGACAGCGCCGCACCACTTCTTCTCAACGGACCCGTTTGAAACGCAACCTGGGGCGTTTTCGTAAAC
Sathy: GCTGGCGATGATGACAGCGCCGCATCATTTCTTCTCCCGGACCCGTTTGAGCGCAACCTGGGA CGTTTTCGTAAAC

Ecoli: GCCGAACGAAGGCACGCTGTTCTATGGTCTGGTGCAGGATGGCAACGATATGTGGGACGCCACTTCTTCTTGCGGTTTC
Sathy: GCCTAACGAAGGCACGCTGTTTACGGAAGTGGTGCAGGACGGTAACGATATGTGGGACGCCACTTCTTCTTGCGGATTC

Ecoli: CTGTGCGGTGATTCTGCTAAGCCGCTGGATGAAATTGGCGGCATTGCTGTGCAAAACCTGACTGAAGATGCGCATAC
Sathy: GTGCGCGGTGATTCTGCTAAGCCGCTGGATGAGATTGGCGGTATCGCGTTGAGACGCTGACGGAAGATGCGCATAC

Ecoli: TTCTCTGCGGTGACCGTCTGTGGCTATACCTCCGCGTATATGCGTATTCCGACAGGCGCGGGGCTGGCGACCGAAAG
Sathy: TTCTCTGCGGTGACCGTCTGAGTTATACCTCAGCGTATATGCGCATTTCCGACAGGCGCGGGGCTGGCGACCGAAAG

Ecoli: TCTGTGGCGCATATCGGTGAGCGTATTCTGCTGGGCGCGCGGATGGTA CAAATCTTCCGTCTCGATAACCCGCTCAC
Sathy: CCTGTGGCGCATATCGGGCAGCGTATTCTGTTGGGCGCGGGTATGGTGCAAATTTTCCGCTCTCGATAACCCCTCTGTT

Ecoli: CGGTAAAGGGCTGAAGTTTGTCTCAGCGGCTATGTTACGTC AACGCATGTTCCACTTCTTGTCGGGCATTCCACGGCT
Sathy: TGGTAAAGGCTTA AAACGTGGCGAGCGGCTGTGTACGTC AACGCATGTTCCACTTCTTGTCGGGCATTCCGCGCT

Ecoli: GATCTTCTGACTGCGCGCTGGCGTTCTGCTGCTTCATGCCTACATCATCTATGCGCCAGCGTTGATGATCGCCCT
Sathy: GATCTTCTGACCGCGCGCTGGCTTTCTGCTGCTCACGCCTATATCATTTATGCGCTGCGTTGATGATTGCGCT

Ecoli: ATTCGTGCTGCGCGCATATGATCCATGCCAGCCTGACCAACTCAAGATCCAGGGCAAAATATCGCCACTCTTTCTGGAG
Sathy: ATTTGTGATACCGCATGTTGCCAGCCAGCCTGACTAACTCAAGATTAGGGCAAGATATCGTCACTCTTTCTGGAG

Ecoli: TGAAATCTACGAAACGGTGCTGGCGTGGTATATCGCACCAACGACGCTGGTGCGCTGATTAAACCCGCACAAAGGCAA
Sathy: TGAAATCTATGAAACGGTACTGGCATGGTATATCGCACCGCCGACTCTGGTCGCGTTGATCAATCCGCACAAAGGCAA

Ecoli: ATTTAACGTCACCGCCAAAGGTGGACTGGTGGAAGAAGAGTACGTCGACTGGGTGATCTCGCGGCCCTACATCTTCCT
Sathy: ATTTAACGTCACCGCCAAAGCGGGCTGGTGGAAGAGAGTACGTCGACTGGGTAACTCTCGCGTCCGTATATCTTCCT

Ecoli: TGTCCTGCTCAACCTGGTGGCGGTTGCGGTAGGCATCTGGCGCTACTTCTATGGCCCGCAACCGAGATGCTCACCCT
Sathy: TGTCCTGCTTAACCTGCTCGGCGTGCGGCGGGCGTATGGCGATACTATTACGGGCGCGAAAATGAAACGCTGACCCT

Ecoli: GGTCTGCTCAGTATGGTGTGGGTGTTCTACAACCTGATTTCTTCTGGCGCGCAGTTGCGGTATCGGTAGAAAGCAAACA
Sathy: CATCTTAGCTTGGTGTGGGTCTTCTATAACCTGCTCATTTCTCGGCGCGCGGTTGCGGTTCGGTAGACAGTAAACA

Ecoli: GGTACGCCGATCGCACCGCGTGGAGATGACGATGCCCGCGCAATTGCCCGCAAGATGCTCACCTCTTCTCTGTAC
Sathy: GGTACGCCGCGCGCATCGGGTGGAGATTGCCATGCCCGGGCCATCGCCCGCAAGATGGACATTTGTTCTCTGTAC

Ecoli: CGTTACGATTCTCTCCGACGGTGGTTTGGGATCAAGATCAACGGTCAGGCGCAGATTCTGGAAGGGCAGAAAGTGAA
Sathy: CGTACATGACTTCTCTCCGACGGCGGTTAGGCATCAAGATCAACGGTCAGGCGCAGCTCTGGAAGGGCAGAAAGTGAA

Ecoli: TCTGTTGCTTAAACCGCGTCAGCAGGAATACGTCTTCCGACCCAGGTGGCGCGCTGATGGGTAAATGAAGTTGGGCT
Sathy: TCTGTTGCTTAAACCGCGTCAGCAGGAATATGTCTTCCGACCCAGGTGGCGCGTAACGGGCATGAAGTGGGCT

Ecoli: GAAATTAAATGCCGCTCACCACCAGCAACATATCGATTTTGTGCAGTGTACGTTTGCCTGCGGATACATGGGCGCT
Sathy: ACAACTGATGCCGCTCACCACCAAAACATATGATTTTGTGCAGTGTACCTTGCCTGCGGATACATGGGCGCT

Ecoli: CTGGCAGGACAGCTACCCGGAAGATAAGCCGCTGGAAAGCTTGCTGGATATTCTGAAGCTCGGCTTCCGTGGCTACCG
Sathy: TTGGCAAGATAGCTTCCCGGAAGATAAACCGCTGGAAAGCTTGCTGGATATTCTGAAGCTCGGCTTCCGCGGATATCG

Ecoli: CCATCTGGCGGAGTTTGGCCTTCTTCGGTGAAGGGCATAATCCGTGTCTGACTTCTCTGGTTTCTGGGTTGTATC
Sathy: CCACCTCGCGGAATTCTCGCCGCTTCACTAAAAGTAATTTCCGATCGTTGACGGCGTTAATTGCTGGATTGTATC

Ecoli: GTTTATTCCGCGCCGCGCGGAGCGGAGCGAAACGGCACAAACATCGGATCAGGCTTTGGCTCA-----ACAATGATG
Sathy: GTTTATTCCGCGCTCGCGCGGAGCGGCAAGCGCGATACAGCCGTCGGATCGGGTTATGGCTCAGGCTCAACAATGATG
Stop bcsA
SDS

Ecoli: ATAAACGCGATGAAAAGAAAACCTATTCTGGATTGTGCGAGTGGCTATGGGATGAGTGGCTTCCCTCTTTTCATGACCG
Sathy: ATAAACGCGATGAAAAGAAAATTTCTCTGGATTGTGCGGCGGTAATAGGATTAAAGCGGTTTCTCTCTTCATGACCG
Start bcsB

Ecoli: AGGCGACGCCAGCAACGCAACCACTGATCAATGCTGAGCCAGCTCTAGCCGCCACAGCGGAACAAAATCCGCGAGGTGG
Sathy: CGGCGGCGCTGCTACGCCGCCATTGATAAATGCTGAACCCAGCCAGCCTGCGCCGTCG-----CCGCAA-----

Ecoli: GGCAAGTGATGCGGGCGTGCAGGGCGCTGATGCGCCAGTCTGGCGCAGAACGGTCTTTCGCGTGATGTGAAGCTGA
Sathy: -----C-----TGAGGCGCCGCTGCTGGCGCAGAACGGTCTTTCGCGCGAGGTCAAGCTGA

Ecoli: CCTTTGCGCAAAATGCACCGCCGCGGGGCGAGCATGGTGTCTACGTGGCATTAAACCCGAACGGCAGCATTGAGTTTGTA
Sathy: CCTTTGCGCAAAATCGCGCCGCGCGGGGTAGTATGGCGCTGCTGGCGGTTAAACCCGAACGGCGCATTGAAATTTGTA

Ecoli: TGCGCAGCGATGAAGTGGTGAAGAGGCGATGCTCAACCTCGAATACACCCCATCGCCATCGTTACTGCCTGTCCAGT
Sathy: TGCGCAGCGATGAAGTGGCGTGAAGAGCGGTGCTGAATCTGGAATATACCCCTCGCCGTCGCTCTGCGCGTTCACT

Ecoli: CGCAGTTAAAGGTTTATCTCAATGATGAAGTGTGGGCGTGTCTGCCAGTGACAAAGAACAGTTGGGTAAAAAACCG
Sathy: CGCAGCTCAAGGTTTATCTCAATGATGAAGTGTGGGCGTACTGCCGCTGACAAAGAGCAGTTGGGGAAGAACCG

Ecoli: TGGCGCAAAATGCCCATTAACCACTGTTTATAGCGACTTCAACCGTGTACGGCTGGAGTTTGTGCGCCATTATCAGG
Sathy: TGGCGCAGGTACCTATCAATCCGCTATTATACCGACTTCAACCGGTGCGGCTGGAGTTTGTGCGCCACTATCGCG

Ecoli: ACGTGTGCGAAAAACCGGCCAGCACACGCTTTGGCTGGATGTTGGGCGGAGCACTGGAAGTGGATCTGACCTATCAGA
Sathy: ACGTGTGTGAAAAACCGGCCAGCACTACTCTGGTTAGACATCGGGCGAAATAGCGCCCTGGATCTGACCTATAACA

Ecoli: CCCTGAATGTGAAGAAATGACCTGTCACTTTCCCGGTGCCATTCTTTGACCCGAGCGATAACCGCACCAACACCTTGC
Sathy: TGCTGCGGTGAATAACGATCTGTCCACTTTCCCGGTGCCGTTTCTTGATCCGCGCGATAACCGTCCAGTGACGTTGC

Ecoli: CGATGGTCTTTTGGGGTGCGCCGGATGTTGGGCTGCAACAAGGCTCTGCCATTGTCCGCTCGTGGTTTGGTTTCGCGTT
Sathy: CGATAGTGTTTTGGCTGATATGCCGGATCTGGCGCAGCAGCAGCGGCTTCTATTGTCCGCTCTGGTTTGGATTCGCGGG

Ecoli: CTGGCTGGCGTGGGCGAACTTTCCCGGTACTCTATAACCAACTGCCGGATCGCAATGCCATTGTCTTTGCAACCAACG
Sathy: CCGGCTGGCGCGCTCAGCGCTTTCCCGGTGTTGTATAATCACTGCCGGATCGCAATGCCATCGTGTTCGCCACCAACG

Ecoli: ACAACCGGCCGACTTCTGCGCGATCATCCGCGGTAAAAGCCCGGTGATTGAGATGATTAAACATCCGCGAATC
Sathy: ATCGACGCCCGGATTCTCTGCGCGATCATCCTGCGGTAAACCGCGCGGTATTGAGATGATGAGCATCCGCGAATC

Ecoli: CTTACGTCAAACCTGCTGGTGGTGTGGTGGTGTGACGACAAAGACCTGTTGCAGGCAAGCAAGGTATCGCTCAGGGTA
Sathy: CGTATGTGAAGTTGCTGGTTGTGTTGGTTCGATGATAAAGACCTGTTGCAGGCGGCAAAAGGTATCGCAACAAGGA

Ecoli: ACATTCTGTTCCGTTGGTGAAAGCGTGGTAGTGAATGAAGTGAACCGCTGCTACCGGTAAAGCCGTACGATGCGCCGA
Sathy: ATATTCTCTTCCGTTGGTTCAGCGTGGTGGTCAACGATGTAAACCGCTGCTGGCGCGAAACCGGTATGATGCGCCGA

Ecoli: ACTGGGTACGTACCGATCGTCCGGTCACTTTTGGCGAAGTGAACCTATGAAGAACAGTTACAATCCAGCGGTCTTG
Sathy: ACTGGGTGCGTACCGATCGTCCGGTCACTTTTGGCGAGCTGAACCTATGAAGAACAGCTCCAGTCCAGTGGGCTCG

Ecoli: AGCCAGCAGCGATTAAACGTTTCTGCTAAACCTGCGCGCGGATCTCTACCTGATGCGCAGTACCGGCTATTGATATGGATA
Sathy: AGCCGGCGGCCATCAACGTTTCTTGAATCTGCCCGCGGACCTCTATTGCTGCGGTAGCAACGGTATTGATATGGATC

Ecoli: TTAATTACCGCTACACCATGCCGCGGTGAAGACAGTTCCGCGATGGATATCAGCTGAATAACAGTTCTCTGCAAT
Sathy: TCAACTACCGTTATACCTCGCCGCCGACAAAGACAGTTCAACGGCTGGATATCAGCTGAATAACAGTTCTCTGCAAG

Ecoli: CCTTCAACCTGACGAGCAAAACAGGAGGCGAACCGCTGCTGCTGCGGATTCCGGTATTACAAGGTTTGCTGGATGGCA
Sathy: CCTTTAGCCTTAAACAGCACGAGGAAACTAATCGACTCTGCTGCGCCTGCGGTACTTCAGGCACTGCTGGATGGTA

Ecoli: AAACAGATGTCTCTATTCCGGCGCTGAAACTGGCGCGACCAACCACTGCGCTTCGACTTTGAGTATATGAACCCGA
Sathy: AAACGGATGTCTCTATTCCGGCGCTGAAACTGGCGCGATGAACCACTACGTTTTCGACTTCCGTATATGAATCCGA

Ecoli: TGCCGGGCGGTTCCGGTGGATAAAGTATTACCTTCCAGCCGGTSCAGAATCATGTGGTGAATGGTGACGACTCCACCA
Sathy: TGCCGGGCGGTTCCGGTGGATAAAGTATTACCTTCCAGCCGGTACAGAATCATGTGGTGAATAGGGGATGACTCCACTA

Ecoli: TCGACTTCTCGAAGTATTACCACTTCATCCGATGCCGGATCTACGCGCTTTGCTAAACGCGGGCTTCCCATTCAGCC
Sathy: TCGATTTTTCGAAATATTACCACTTTATCGCGATGCCGGATTTACGCGCTTTCGCAATGCGGGTTTCCCGTTTCAGCC

Ecoli: GGATGGCGGATCTGTGCAAAACCATCACCGTGATGCCGAAAGCGCCTAACGAAGCACAGATGGAACCGTTGCTGAATA

Sathy: GGATGGCCGACCTGTCTGACACGCTGGCGGTGATGCCGAAGAGCCCAACCGAAGCCAAATGGAACCGCTGCTGAATA

Ecoli: CTGTTGGTTTTATCGGCGACAGACGGCTTCCCGGCGATTAATCTGACGGTGACCGATGATGGCAGCACCATTCACG

Sathy: CCGTCGGCGCCATTGGCGACAGACGGCTTCCCGGCGAATTAATCTGACAATCACCAGATGATAGCGCTCAGATAGCCG

Ecoli: CCAAAGATGCCGACATCATGATCATCGGTGGTATCCGGACAAACTGAAAGACGATAAGCAGATCGACCTATTGGTGC

Sathy: ACAAAGACGCCGATCTGCTGATTATAGCGCTATTCGGGCAAGCTAAGACGATAAGCGTATCGATCTGTTGGTGC

Ecoli: AGGCGACCGAAAGCTGGGTGAAAACCCGATGCGCCAGACCCCGTTCCCGGCGATTCTGCCGGACGAGAGCGATCGCG

Sathy: AGGCGACACAAAGCTGGGTAAAACCCGATGCGCCAGACCCCGTTCCCGTCCGATTATGCCGGATGAGGCCGATCGCG

Ecoli: CGGCAGAAACCCGGTCAACGCTGACCTCTTCGCGTGGATGGCGGCGGGTGATTGGCTTCCAGTCGCCGTATAACGACC

Sathy: CGGCGGATGCGCAGTCCACCGTCACCGCCAGCGCCCGATGGCGGCGGGTGTTGGCTTCCAGTCGCCGTATAACGATC

Ecoli: AGCGCAGCGTGATTGCGCTGTGGCAGATAGCCCAACGCGTTATGAAATGCTTAACGATGCGGTGAACGATAGCGGCA

Sathy: AGCGCAGCGTGATTGCTCTGCTGGCTGACAGCCCGCGCGTTACAGCTACTGAACGACGCCGTGAACGACAGCGGTA

Ecoli: AACGCGCCACCATGTTTCGGTTCGGTGGCGGTGATCCGCGAGTCCGGTATCAACAGCCCTACGTGTTGGCGACGTTTATT

Sathy: AACGCGCCCGCATGTTTGGTTCGGTGGCGGTGATCCGCGAGTCCGGCGTTACAGCTCTGCGCGTTGGCGATATCTATT

Ecoli: ACGTAGGTATCTGCGCGTGGTTCGAGCGCGTGTGGTATGCGCTGGCAAAACCATCCGATTCTGCTGGCGGTGCTGGCGG

Sathy: ACGTCGGACATCTGCGCGTGGTTCGAGCGCGTGTGGTATGCGCTGGCAATCACCCGGTGCTGCTGGCGGTACTGGCGG

Ecoli: CTATCAGTGTGATATTGCTGGCATGGGTACTGTGGCGTCTGCTGCGAATTATTAGTCGTGCTGCTCTTAACCCGGATA

Sathy: CCTCAGTGTGATATTACTGGCTGGGTATTGTGGCGTCTGCTACGTATTCTCAGTCGCGCTGCTCTCGACCCGAGCC

Ecoli: ACGAGTAATTGAAGATGAATGTCTTGGCTAGTGAATCGTGACGATGCTGCTGCTGCGCTGCCTTTAGTGTTCAGGCAG

Sathy: ATGAGTAACGATGACTATGCTGCGCGATGGATAACGATGCTGCTCATGCTGACGGCAATTAATGCGCAGGCAG

Stop *bcsB* Start *bcsZ*
SDS

Ecoli: CCTGTACTTGGCCTGCTGGGACAGTTTAAAGGATTACATCAGTCAGGAAGGCGCGTATCAGACCCAGCGACG

Sathy: CCTGTACTTGGCCTGCTGGGAAAGATTCAAGAAAGATTACATTAGCCAGCAGGACGCGTATCGATCCGGGCGATG

Ecoli: CGCGCAAAATCACCACCTCCGAAGGGCAAAGTACCGCATGTTCTCTGCCCTGGCGGCTAACGACCGTGCAGCTTTCC

Sathy: CGCGCAAAATCACCACCTCCGAAGGGCAAAGTACCGCATGTTCTTGGCCTGGCAGCGAACGATCGACCGCGTTCC

Ecoli: ATAATATTCTCGACTGGACGCAACAATCTCGCTCAGGGTTCTTTAAAGAAACGTTTGGCCGCTGGCTGTGGGGCA

Sathy: CGCAACTGTTTAACTGGACGCAACAATCTGCGCAGGGATCGTTGCGTGAATATCTGCCCGCTGGCTGTGGGGGC

Ecoli: AGAAAGAGAACAGTAAGTGGGAACTGCTGGACAGCAATTCGGCTCCGATGGTGATGCTTGGATGGCTTGGTCTGTGC

Sathy: AAAAAAGATCCGACACCTGGTCCGTGCTGGACAGCAACTCCGCTCCGACGGCGATATCTGGATGGCATGGTCTGTGC

Ecoli: TGGAGGCGGGCGGTTTGTGGAAAGAGCAGCGTTATACCGACATCGGCAGCGCGTTGCTAAAACGATACGCGCGGGAGG

Sathy: TGGAGGCGGCTCGTCTGTGGAAAGAGACGCGTTATACCGAGGTGGGACCGCGTTGCTAAAACGATACGCGCGGAGG

Ecoli: AAGTGGTGACGGTGCCCTGGGCTGGGTTCATGTTGTTACCGGGCAAAGTGGGTTTGTCTGAGGATAACAGCTGGCGTT

Sathy: AAGTCTGAAATGTGCCGGGCTGGGCTCAATGCTGCTACCTGGCAAATCGGCTTTGCCGAGGCGAATAGCTGGCGTT

Ecoli: TTAACCCAGCTACTGCGCGCCAGCTGGCGCAGTATTTACCGCTTTGGCGCGCGCTGGACACCGCTGCGCGAAA

Sathy: TTAACCCAGCTATCTGCGCGCCAGCTGGCGCAATACTTTAGCCGTTTGGCGCGCGCTGGTCCAGCTTACGGGAAA

Ecoli: CCAATCAACGTTTATTGCTGGAAACCGCCCGAAAGGTTTTTCGCCAGACTGGGTGCGCTATGAGAAAGACAAAGGCT

Sathy: CCAATTTGCGGCTTTTGTGGAAACCGCGCCGAAAGGTTTTCTCGCCGACTGGGTGCGTTATGAAAGCAAGCAAGGCT

Ecoli: GGCAGCTAAAAGCGAAAAAACATGATCAGCAGCTACGACCGCTATCCGCGTTTACATGTGGGTAGGCATGATGCCGTG

Sathy: GGCAGTTGAAAGCGAAAAAGACGCTGATCAGTAGCTACGATGCGATTCCGCTTATTATGGGCGGAATGATGCATG

Ecoli: ACAGCGATCCGCAAAAAGCGCGGATGCTCAACCGGTTTAAACCGATGGCGACATTCAGTGAGAAAAACGGTTATCCGC

Sathy: ATGGCGATCCGCAAAAAGCGCGTTTACTGGCGCGATTTAAACCGATGGCGACGTTAACGATGAAAAACGGCGTTCCAC

Ecoli: CGGAAAAAGTGGATGTGGCTACGGGAAAGCGCAGGGTAAAGGACAGTCCGTTTCTGCCGCCATGCTGCCCTTTT

Sathy: CGGAGAAAGTGGATGTGCTCAGCGGGAATGCGCAAGGGACGGGCGCGTCCGTTTCTGCCGCCATGCTGCCCTTTT

Ecoli: TCAAAAACGCGAGCGCAGGCCGTGAGCGCAGCGCGTGGCGATAAATTTCCGGCAGCGATGCCTATTACAAC

Sathy: TCAAAAATCGCGAGCGCCAGGCCGTGAGCGGACGCGGTCGACAGCATTTCCCTGGCAGCGATGCCATTACAAC

-35 -10 *bcsC* TS

Ecoli: ATGTGCTGACCTCTTTTGGACAAGGCTGGGATCAACACCGTTTTCGCTTCTGACAAAAGGTGAGTTATTACCTGACT

Sathy: ATGTGCTGACTCTCTTTGGACAAGGCTGGGATCAACACCGTTTTCGCTTACCGTCAAGGTGAATTATTACCTGACT

SDS

Ecoli: GGGGCCAGGAATGCGCAAAATTACACTAAA-----

Sathy: GGGGCCAGGAATGCGCAAAATTACACTAAA-----

Start *bcsC*-Variante 2 Stop *bcsZ*

Ecoli: -----CATATTCCG-----CTTTCCCTCGGTCTGGCCGTCATGCCGATGGTCCAGGCAGCACCAAC

Sathy: CAAAAGGGGCGTTTCTCGGGCATTGTTGGGTTTATCGCTTGGTTGGCGCTAACACCGCTTGCCTGGCGCAGCGACCTC

Ecoli: CGCTCAGCAACAGTTGCTGGAGCAAGTTTCGGTTAGGCGAAGCGACCCATCGTGAAAGATCTGGTGCAACAGTCTGTTATA

Sathy: CGCGCAGCAACAGTTGCTGGAGCAAGTTTCGGTTAGGCGAAGCGACCCATCGTGAAAGATCTGGTGCAACAGTCTGTTATA

Ecoli: TCGGCTGGAACTTATTGATCCGAATAACCCGGACGTGTTGCCGCCCGTTTCCGTTCTTTGTTACGTACAGGGCGATAT
Sathy: TCGCCTGGAGCTGATCGACCCCAATGATCCACAGGTATCGCCGCCCGTTTCCGCTATCTGTTGCGCCAGGGGGATAG

Ecoli: TGATGGCGCGCAAAAACAGCTCGATCGGCTGTGCGAGTTAGCGCCGAGTTCAAATGCGTATAAATCGTCGCGGACTAC
Sathy: CGACGGGGCACAAGAGCTACTTGACCGGCTGCGCAACTGCGCCCGAGTGCACGCGGTACATCTTCCCGCACCGC
SDS

Ecoli: GATGCTACTTTCCACGCCCGATGGTGGTCAGGCACCTGCAACAGGCACGATTGCAAGCGACGACCGGTATGCGAAGACA
Sathy: CATGCTGCTCTCCACGCCCGAAGACGCCAGTCTTTGCAAGAGGCGCGTTTACTGGCGACGACCGGCATACCTGAAACA
Start *bcsc*-Variante 1

Ecoli: AGCTGTGGCGAGTTACAACAAACTGTTCAACGGTGCGCCGCCGGAAAGGTGACATTGCTGTGCGAGTACTGGAGTACGGT
Sathy: AGCGATCGCCAGCTACGACAAGCTGTTTAAAGGTTATCCGCCGGAGGGCGAAGTGGCGTCAATACTGGACGACCGT

Ecoli: GCGCAAAATTCCGGCTCGCCGTGCGAAGCGATTAAATCAGTTAAACGCATCAATGCGGATGCAACGGGCAATACGGG
Sathy: GCGCAAAATTGCCCGCCCGCCGTCAAGAACGATTAAACAGCTACAGAAAATCAATGCGCTCAGTCCGGGTAATAACCG

Ecoli: CCTGCAAAAATCTGGCGCTATTGCTGTTTAGTAGCGATCGCGTGCAGAAAGTTTTCGGCTCTGGAACAGATGGC
Sathy: TCTGCAAAAATGCGCTGGCGCAACTGTTGTTTCGCCAGCGGGCGCGCGATGAGGGATTCCGCGGTGCTTAAACAGATGGC

Ecoli: AAAATCGAACGCGGGCGCGAAGCGGCCTCTAAAATCTGTTACGGCAGATTAAAGACATGCCCGTCTAGTGATGCCAG
Sathy: GAAATCCAGTACGGGACGCGAGCGCGGCCTCGCCATCTGTTACAGCAGATAAAAGATCTCCCGGTTAGCGACGCCAG

Ecoli: TGTGTGCGCGCTGAAAAAATATCTCTCGATCTTTAGTGATGGCGATAGCGTGGCGGCTGCGCAATCGCAACTGGCAGA
Sathy: CGTAAAAGCGTTGCAAGACTATCTGACGCGAGTTTAGCGAAGGCATAGAGCGTGTCTGCCGCCCGCGCCAGCTTAGCGA

Ecoli: ACAGCAAAAACAGCTGGCCGATCCTGCTTTCCCGCGCTCGTGCGCAAGGTTTAGCGCGGTTGAATCTGGTATGGCGGG
Sathy: GCAGCAAAAACAGTTAGCCGATCCGCGCTTCCGTGCGCGCTCGCAGGGCATCGCGCGGTTAATGCCGGAGAAGGCGG

Ecoli: TAAAGCCATTCCCGAACTACAAAGGCGGTGCGCGCGAACCAGAAAACAGAGTGAAGCTCTGGGGCGGCTGGGCAGGC
Sathy: TAAGGCCATTGCGCAATTGCGAGCAGGCGGTGAGCGCGCGGAGGACGACAGCGAGCGGGTCCGCGCGCTGGGGCAGGC

Ecoli: GTATTCTCAGAAAGGCGATCGCGCCAAATGCAGTGGCAATCTGAAAAAGCCCTCGCACTGGACCCGCACAGCAGCAA
Sathy: ATACTCAGCGGTGGCGATCGCGCCCGCGCGCTGCGCAGTTTGAAGAAGCGCTGGCGATGGCGCCGCACAGCAGCAG

Ecoli: CAAACGACAAATGGAACAGTCTGCTGAAAGTAACCGCTACTGGCTGCGGATCCAGCAGGGCGATGCTGCGCTGAAAGC
Sathy: CCGCGATAAGTGGGAGAGTCTGCTGAAGTCAATCGCTACTGGCTGTTAATTACAGCAGGGCGACGCGGCTTAATAAGC

Ecoli: CAATAATCTGACCGGGCAGAACCGCTGTTTCAGCAGGCGCGTAATGTGATAACACCGACAGTTATGCAGTGTCTGGG
Sathy: GAATAATCTGGCCAGGGGAGCGTTTCTATCAGCAGGCGCGAGCAGTGGATAACACCGACAGCTACGCGGTACTGGG

Ecoli: GCTGGGCATGTGGCGATGGCGCGAAAAGATTATCCCGCCGCCGAACGTTATTATCAGCAGACCTTGCGTATGGACAG
Sathy: GCTGGGGATGTGGCGATGGCGCGAAAAGATTATCCCGCCGCCGAACGTTATTATCAGCAGACGCTGCGTATGGATAG

Ecoli: CGGCAACACTAACGCCGTGCGCGGGCTGGCAAAATTTTACCGCCAGCAATCGCCAGAAAAAGCTGAAGCGTTTTATCGC
Sathy: CGGTAATACCAATGCTGTACGCGGGCTGGCAATCTTTATCGCCAGCAGTCCGCCAGAAAAAGCCCGCGTTTTATCGC

Ecoli: CTCGCTCTCTGCCAGTCAGCGGCGTAGCAATTGATGATATCGAACGCAGCCTGCAAAACGACCGTCTGGCAACAGCAGGC
Sathy: TTCTCTTTCCGCCAGCCAGCGGCGCAGTATCGACGATATCGAACGCAGTCTGCAAAATGACCGTCTGGCGCAGCAGGC

Ecoli: AGAGGCACTGGAACACAGGGCAAATGGGCGCAGGCGGCAGCACTTCAGCGGCAACGACTGGCGCTGACCCCGGCGAG
Sathy: GGAACGCTGGAACCGAGGGCAAATGGGCGCAGGCGGCAGCACTTCAGCGGCAACGCTCGGCTGGCATTAGATCCGGGCGAG

Ecoli: CGTATGGATTACTTACCGACTTTCCGAGGATCTCTGGCAGGCGCGCAAAACGAGCAGGCGCGATACGTTAATGCGCAA
Sathy: CGTGTGGGTGACGTACCGACTGTACGCGATCTCTGGCAGGCGCGGCGAGCAGCTCAGGCGGATGCCAATGCGCTC

Ecoli: TCTGGCGCAGCAGAAGTCGAACGACCCGGAGCAGGTTTACGCTTACGGGCTGTACCTCTCTGGTCATGACCAGGACAG
Sathy: TCTGGCGCAGCAGAAGCCAACGATCCGGAACAGGTTTATGCTTATGGGCTTTATCTTTCCGGCAGCGATCGGGACCG

Ecoli: AGCGGCGCTGGCGCATATCAATAGCCTGCCGCGTGCGCAGTGGAAACAGCAATATTCAGGAGCTGGTTAATCGACTGCA
Sathy: GCGGCGCTGGCGCATCTCAATAGCCTGCCGACCAGCAGTGGAAACAGCAATATTCAGGAACCTGGCGGGCCGATTGCA

Ecoli: AAGCGATCAGGTGCTGGAAACCGCTAACCGCCTGCGAGAAAGCGGCAAGAGGCAAGAGCGGAAGCGATGCTGCGCCA
Sathy: AAGTAACAGGTGCTGGAAACCGCTAACCGCCTGCGCGATAGCGGCAAGAACGCGAAGCGGAAGCGTTGTTACCTCA

Ecoli: GCAACCACTTCACCGCTATTGACCTCAGCTGGCTGACTGGGCGCAACAACGAGCTGATTACACCGCCGCCCGCGCG
Sathy: GCAGCCGCCCTTACCGCGATTGCTTAACCTTGGCGGACTGGGCGCAGCAGCTGCGGATAATGCGCGGCCCGCGCG

Ecoli: TGCATATCAGAATGTCCTGACGCGGGAGCCAGCTAAACGCCGACGCCATTCTTGGTCTGACGGAAGTGGATATTGCTGC
Sathy: CGCTTATGACCGCGTTCTGGCGCGGGAACCGGTAATGTGATGCCATGCTGGGCGGGTGGAAATCGACATCGCACA

Ecoli: CGGTGACAAAGCGCGCGCACGTAGCCAGCTGGCGAAAACCTGCCCGCTACCGATAACGCTCTGCTGAACACACAGCGCGC
Sathy: GGGCGATAACGCTGCGGCGCGCGCTCAGCTGGCGCGCTGCGCTGCTGCAAAATACCTCTATTACATGCAGCGCGC

Ecoli: CGTGGCGCTGGCACAGGCGCAGCTTGGCGATACCGCAGCAGCGCAGCGGACGTTTAAATAAGTTGATCCCGCAGGCAAA
Sathy: CGTGGCGCTGGCACAGCTTGGCGATACCGCAGGCGCGCGGACCTTCAACCGCATTACCGCGCAGGCAAA

Ecoli: ATCTCAGCCACCGTCCGATGGAAGCGCGATGGTCTGCGTGATGCTGCGAAGTTTGAAGCGCAGGCGGGCGATCCAAC
Sathy: AGCACAGCCGCCATCAATGGAAGCGCGATGGTATGCGTGACGCGCGCGCTTTTCAGGCGCAACCGGGCGAGCCGCA

Ecoli: GCAGGCGCTGGAAACCTACAAAGACGCATGGTCGCATCCGGTGTGACTACGACGCGTCCGCAGGATAACGACACCTT
Sathy: GCGGGCGCTGGAGACCTACAAAGACGCAATGGTCGC CGCGCGATTACGCCGTTTCGTCCGCAGGATAACGATACCTT

Ecoli: TACCCGACTGACCCGTAAACGACGAGAAAGATGACTGGCTGAAACGTGGCGTGCAGCGATGCGGCGGACCTCTATCG
Sathy: TACCCGCTGACCCGCAATGATGAAAAAGACGACTGGCTAAACCGCGCGTGCATAGCGATGCGGCGGAGTTGTACCG

Ecoli: CCAGCAGGATCTTAACGTCACCTTGAGCAGCATTA CTGGGGTTCGAGCGGCACCGGTGGTTACTCCGATCTGAAAGC
Sathy: TCAGCAGGATCTCAATGTCACGTTGGCGCAGCATTA TGGGGTTCGAGCGGCACCTGGCGTTACTCCGATCTGAAAGC

Ecoli: GCACACTACCATGTTGCAGGTGGATGCGCCGTATCTGACGGCGCGATGTTCTTTCGCTAGTGATTTCTCAATATGAA
Sathy: GCATACCACGATGCTTCAGGTGGATGCGCCCTGGTCGGACGGACGGCGTTCTTTCGTA CTGATATGCTGAATATGCA

Ecoli: CGTCGGCAGTTTCTCCACTAATGCCGATGGCAATGGGATGACAACTGGGGCACCTGTACATTACAGGACTGTAGCGG
Sathy: TGTGGCCGCTTCTCTACGGATGCGGATGCAAAATACGATAA TAACTGGGGTACCTGTACGCTGCAGAAATGCAGCGG

Ecoli: CAACCGCAGCCAGTTCGGATTCCGGTGCCAGCGTGGCGGTCCGCTGGCGAAATGACGTCTGGAGCTGGGATATCGGTAC
Sathy: ACATCGTAGCCAGCCGATACGGCCGCGAGCGTGGCGGTCCGCTGGCGAATGAGACCTGGCGCTGGGATATCGGCAC

Ecoli: CACGCCGATGGGCTTCAACGTGCTGGATGTGGTGGCGGCATCAGTTACAGCGATGATATCGGGCCGCTGGGTTACAC
Sathy: GACGCCGATGGGCTTTAATGTCGTTGATGTGGTGGCGGCTCAGCTATAGCGACGATATCGGGCCGCTGGGTTATAC

Ecoli: CGTTAACGCCACCGTCGCCCATCTCCAGTTCCTTGCTGGCCTTTGGTGGGCAAAAAGACTCCCGAGCAATACCGG
Sathy: CCTGAACGCGCATTCGTCGCCCATCTCCAGTTCCTTGCTGGCCTTTGGCGGGCAAAAAGGATGCCAGCAGCAATACCGG

Ecoli: GAAAAAATGGGCTGGCGTACGTGCCGACGGTGTGGGGCTAAGTCTGAGCTACGATAAAGGTGAAGCAAACGGCGTCTG
Sathy: CACCAAATGGGGCGGCGTCCGGGCCAACGGCGCGGCGCTCAGTCTCAGCTATGATAAAGGCGAAGCAAACGGTGTCTG

Ecoli: GGCATCGCTTACTGGCGACCAGTTAACCGGTAAAAATGTCGAAGATAACTGGCGCGTGGCTGGATGACGGGCTATTA
Sathy: GGCGTCGCTCAGCGCGCACCAGTTACGCGGTAAAAATGTA GAAGATAACTGGCGCGTGGCTGGATGACCGGTATTA

Ecoli: CTATAAGGTATTAACGAGAACAAATCGCCGCGTACAAATCGGCCTGAACAAACATGATCTGGCATTACGACAAAGATCT
Sathy: CTATAAGGTATTAACGAGAAATAACCGCCGCTGTACCGTCGGGCTGAATAACATGATCTGGCATTACGACAAAGATCT

Ecoli: GAGTGGCTACTCACTCGGTGAGGGCGGTTACTACAGTCCGCAGGAATACCTGTCTGTTTGCATACCGGTGATGTGGCG
Sathy: GAGCGGTATTTCACTGGGTGAGGGCGGTTATTAAGCCGCAGGAATACCTGTCTGTTTGCCTGCGGTGCGGTGATGTGGCG

Ecoli: CGAGCGCACGAAAACTGGTCGTGGGAGCTGGTGGCTCTGGCTGCTGGTGGTTCATCCGACCAAAACCATGCGCGG
Sathy: CGAGCGTACGAAAACTGGTCGTGGGAGTTAGCGCGCTCGGTATCTGGTGGCTCTCCGCAACCGTACCATGCGCGG

Ecoli: TTATCCGCTGATGAATCTGATCCCGACCGACTGGCAGGAAGAAGCTGCGCGGC-AATCCAACGATGGCGGCAGCAGTC
Sathy: TTATCCGCTGATGAATTTGATCCCGCAGATTATCAGGAGGATGC-GCGTGACAGACCAACGCGCGCGGCAGCAGCC

Ecoli: AGGGCTTCGGCTACACGGCGCGGCATTACTTTGAACGACGTTGTTACTTCCAACCTGGTTGTGGCACGGCAATTGATA
Sathy: AGGGATTTGGCTATACCGCGCGGGCGCTCATTGAACGCGGTTACTTCCAACCTGGTTGTGGCTACGGCTGTGATA

Ecoli: TCCAGCAGGCGAAAGATTACGCAACCCAGCCATTTCCTGCTCTACGTAAGTTATTCCGCCGCCGATGGCAGGGTGACA
Sathy: TTCAGCAGGCGAAAGACTATACCCCGAGTCATCTGCTGTATGTTTCGTTATTCCGCCGCCGGCTGGCAGGGGATA

Ecoli: TGGATTTACCGCCGAGCCGCTGATACCTTACGCCGACTGGTAAG-----
Sathy: TGGATTTACCGCCGAGCCCTCTGCTGCCTTACGCTGACTGGTAA TCATTGCGTCAGGCCTACGAATTGACAGGCGTCCG

Stop *bcsC*

Ecoli: -----TTTTCAGATAGCGCCTCTC
Sathy: TAGGCCTGAGAAGCGCAGCGCCATCAGACGCTATCATTAAACCGTTATTTCAGAAAAGTCC TTTTCAGATACAGCCTCTC

Ecoli: TTAATGCCGCTGCGATCGGGTATACTCGGGCGCAATCTGGGATTTCGGGGGAGACAATTTGCGCGTAAGTCGCTC
Sathy: TTAATGCCGCTGCAATCGGGTATACTCAGGCGGCAGTCCGGGATATCCAGGAGAGTCAATTTGCGCGTCAGCCGCTC

Ecoli: GTTAACAATCAACGAGATGGCAATGGTGGCAGCCGTTGTCCTGCTGTTTCGTTTTTATTTTTCACCGTTTTGCTGTT
Sathy: GTTAACAATTAACAGATGGCAATGGTGGCGCCGTTGTCATGATGTTTCTTTTTGCTTTTTCACCGTTTTGCTGTT

Start *yhjK*

Abkürzungenleutung: Ecoli (*E. coli*), Sathy (*S. Typhimurium*), SDS (Shine Delgarno Sequenz), TS (Transkriptionsstart). Für das Gen *bcsC* sind die zwei möglichen Startkodons markiert (s. Kap. III.1.14.).

VII.2. Alingment von Curli-Fimbrien Operons *csgBAC* und *csgDEFG*

(DNA-Sequenz aus dem *S. Typhimurium* LT2-Genom von 1229536 bis 1232391 bp. s. Abb. 48)

```
Sathy: GAAGATATATTTTAACTCAAGACGACAACTCAATCGGTT--GATTAGCAGGTAAAGATAGCGTTTGTTT
Citsp: GCAGAGATATTTTAACTCAGTCTGTCAAATCAATGGCCCTGGATTAGCGGGTAGAGAAAGGTCITTTTT
Citfr: GGTGAATATTTAAAGCTCAGTTTAGTTAATCAATCGCCCC--GATTAGCGGGGACCGAAAGGCTTGTTTT
Ecoli: GGGGAATATTTTAACTCAACTTCCTCAAAGCAATGGGTT--GATTAGCAGGCAATGAAAGGTCITTTTT
Entsa: GCTGAGATATTTTAACTCAAGCGCAATTAATCAATCGCCT--GATTAGCGGGGATAAAAAGTGTGTTTTG
```

```
Sathy: TTGCTCTGTATGGCTTTGTCCCCCGACGCGCTCGCGGACAGAGAGAAATTGACCTGACAGACGCAGGGT
Citsp: CTGTCCTGACTGACTTTTGCCTCCCGCACGCGCTCACGAAGGGCTAAATTTTGACCTGGCACACACAGGCT
Citfr: CTGCTCGGATTGGCTTTGTCCCCCGACCCCTTTACGTATGCGGAGGACTTGTACCTCACATACGCAGGCT
Ecoli: TTGCTTCTGTCTGACTTTGCTGGAAGTGCCTTCGCGGAGGACAAATTTGTACTCTGCACAGACAAGAT
Entsa: CTGCGCGGATGAACCTTTGTCCACTCTGCCTTCGCGGAAAGAGACAACTGGACCTGACATCACACGAT
```

```
Sathy: TCGTTTAAATGTGACCTGAGGGATCACCGTGTAAATATCGCCCTTGCTGAGTCTGTGGTAAACGTAATCTGAT
Citsp: TGTCTCAGGGTGACCTCGGCGTAATCGTGTAAATATCGCCCTTGCTGGTGGTTGCAAAACGTTATCTGAT
Citfr: TGAGTTAAAGTCACTGAGGAATAATGGTGTACATATCACCTTGCTGAGTTGTATTGAATGTTATTTGAT
Ecoli: TGAATAAGAGTGACTTCAGGAATAATGGTATACATATCCCTTGCTGGTTCGTATTAAAGGTTATCTGAC
Entsa: TCCGTCAACGTGACCTCGGAATAATGGTGTCAATATCGCCCTGCTGTGAGGTTTGAAAGGTTATCTGCG
```

```
Sathy: TTGAAGTGCCGCAAGGAGCAATAAAGTATGCATAATTTCTCCCGAAAAAAA--CAGGGCTTATGCCCT
Citsp: TAGAGAGCGCCGCAAGGAGTAATAAGTGTTCATGATGCTCTCCCGAAAAAAA--CAGGGCTTTCGCCCT
Citfr: TTGCCAGCGCCGCAATGAGTAATAGCTATGCATCTATTCTCCCGAAAAAAAACAGGGCTCAGGCCCT
Ecoli: TGAAGTGCCGCAAGGAGTAATAAGTATTATATCTCTCTCCCGAAAAAAA--CAGGGCTTGCGCCCT
Entsa: TCGACAGCGCCGCGAGGAGAAATTAAGTATTATATTAATCTCCCGAAAAAAA--CAGGGCATCAGCCCT
```

Stop *csgA*

```
Sathy: GTTTTATTATTAGCGCAGACGCT-AAAATTAACTAGCTTACCGCTGCGGTGTTGCCAAAACCAACCTGA
Citsp: GTTTATC-GTCAGCATAAACT-CAATTAGTACTGTTAGCGGTGCGGTGTTGCCAAAACCAACCTGA
Citfr: GTTTATT-ATCAGTCAGAAAACCT-CAATTAGTGTGTTAGCTGTAGCGTGTGTTACCAAAGCCAACCTGC
Ecoli: GTTTCTG---TAATACAAATGAT-CTATTAGTACTGATGAGCGTTCGCGTGTGTTACCAAAGCCAACCTGA
Entsa: GTTTTATT--GTAGCAGATGTCACTATCAGTACTGATGAGCTGTGCGGTGTTACCAAAGCCAATCTGC
```

```
Sathy: CGCACCATTAACGCTGGAATCAGATGCGGTCTGATTACACAGCGCGCGGTATTACCGCGCTATTGACCGA
Citsp: TGCACAGAACGCTGGAATCGGACGCGCTCTGGTTACACAGTGCGGCGTTATGTCCACCATCTGCGCTCA
Citfr: TGAATCAGCACATTTGAGTCAAGAGGCTGTCTGATTACCAACGCACCGTTGCGGCCACCGAAGTGGTCA
Ecoli: GTCAGGTTGACGGAGGAGTTAGATGAGTCTGGTCACTGCAGCACCGTTGCCACCACCGAAGTGTTA
Entsa: GTACGTTGACGCTGAGATTAGACGCGGTCTGGTCTACAGTGCGCCGTTAAGGCCACCGTACTGGCTGA
```

```
Sathy: CAGTAATATCGGACTTTTGTAGCGTTCCACTGGTCTGATGGTGGCATTTGTTTCTGAAACCATCTGAGTCAG
Citsp: CAGTAATGTCCGAATTTTGTGCGTTCCACTGATCGATGGTGGCGTTGTTTGTGAAGCGCTTTTGAGTCAG
Citfr: CGCTAATATCAGCATTTTGTGCAATCCACTGATCGATAGTGGCACTGTTCTGGAAGCCGCTCTGTTTTCAG
Ecoli: CCGTCATTTAGAAATTTTGTGCGTTCCACTGATCGATAGTGGCACTGTTTACCGAAGCCAGTGTGGTTCAG
Entsa: CATTCATCACGGAATCTTTACTGTTCCACTGATCAAGTGTGCGACTGTTGCCAAATCCGTCTGGGTGAG
```

```
Sathy: TTCAATAGTACTGTTATCCCGCACCTGGCCCTACATCGCGGCCGTTACCATAAACCGCTCTGGGTAATGGTC
Citsp: ATCCATGGTGCTGTTATCTGAGCCCTGGCCCAAGCTCTGGCCGTTACCAAAGCCATTCTGATGAATGGTC
Citfr: GCTAATGGTACTGTATCAGCACCTGGCCCAACACAGCTCCGTTGCCACGCGCGTGTGTGTGATGGTG
Ecoli: ATCCATTCAGCTGTATCTGAGCCCTGACCAACATCTGCACCATTAACCGCCCGCATGCTGGGTAATAGTC
Entsa: GTTAATGCTACTGTCTGACACCCCTGACCAACGTCAGCGCCGTTACCGCCACCGGTCTGGCTAATATTC
```

```
Sathy: GTTTCAGATTTACCGCATCGCTTTGCAGAGCAAGCGCAGCGTTAGCGAAACCGTACTGATAAATGCTCA
Citsp: GTATCAGATTTACAGCGTCGCTTTGCAGCGCAAGCGCGCGTTATTACTCCTGACTGATAAATGCTCA
Citfr: ACATCTGATTTACCGCATCACTTTGCAGAGCAATTTGCAGAGTTGTTTACCGCATATTGGTAGATACTCA
Ecoli: AAGTCAGAGTTACCGCATCAGTTTGAGAGCAAGTCAGAGTTACCGCCACCGTACTGTAATGTTCA
Entsa: AGAAGTGAATTTCTGCGATCAGTTCTGCAGGGCCAGCGGGAGTTACCGCCACCATCTGGTAAATATTCA
```

```
Sathy: ACCTGGAATCCGGGCGGAACATTTCCGCGCGCGTTATGATTACCGCGCGCGCCCATGTTGGAACGAC
Citsp: GGGTCGATTCCGGGCGGAGCTGCTCCGCGCGCGCGCG---CCACCGCGCGCGCCCATGTCGGAACAGA
Citfr: GTGAAGAGTCTGGGCGATAATTACTGCCACCAACCATGA-----TGATTCCGCGCGCCATGCGGAACAA
Ecoli: GCTCAGAATTTGGGCGGCTATTATACCGCCACCAACCGTGTTACCGCGCGCGCGTACTGAGGAACAAC
Entsa: GGGTTGAATTTGGGCGACCGTATCCGCGATGACCATGT---CCATGACCCCATCCGCGCGTGAATATCAT
```

```
Sathy: GCCAGCCAGAGCACTCCAGAAACTACGATTGCTGCGAATGCTGCCACTTTTAAAAGTTTCATGGTAAAA
Citsp: ACCAGCCAGAGCACTCCAGAAACACGATTGCTGCAATGCTGCCACTTTTAAAAGTTTCATGGTAAAA
Citfr: ACCAGCCAGAGCACTCCAGAAACTACGATTGCTGCGAATGCTGCCACTTTTAAAAGTTTCATGGTAAAA
Ecoli: ACCAGCCAGAGCACTACCGGAGAAACGATTGCTGCAATGCTGCCACTTTTAAAAGTTTCATGGTAAAA
Entsa: ACCAGCCATAGCACTACAGAAACTACGATTGCTGCGAATGCTGCCACTTTTATAAATTCATGGTAAAA
```

Start *csgA*

SDS

Stop *csgB*

```
Sathy: CCCCACATCGGATTGATTTAAA-AGTCGTACCGGTAATACCGGTGGGTGACGCGAATAGCCATATGCGACT
Citsp: CCCCCATCGGATTGATTTAAG-CGTCGTCAATGGATTAGCGTTGAATTAACGCGAATAGCCATTTGCGACT
Citfr: CCCCCATCGGATTGATTTAAA-CGTCGTCAATGGATTAGCGTTGATGACGCGAATAGCCATTTGCGACT
Ecoli: CCCCCATCGGATTGATTTAAA-AGTCGAATGGAATTAACGTTGTGTCACGCGAATAGCCATTTGCGACT
Entsa: CCCCCATCGGATTGATTTAAGTCGTCCGAAATAATAGCGTTGAATTAACGCGAATAGCCATCTGCGACT
```

Sathy: GTTCTGCACTACAACTGCTGTTTTCTGCGTACCGTACTGGGTAATATTGGCCTTATTTCCAGAACCTTT
 Citsp: GTCTCTGCACITACAACTGCTGTTTTTTCGCGTACCATCTGAGTAATATTGCTTTATTTCCAGAACCTTT
 Citfr: GTCTCTGCACCACAACTGCTGTTTTTTCGCGTACCGTACTGGGTAATATTGGCTTTATTTACCAGAGCCTTT
 Ecoli: GTCTCTGCACITACAACTGCGGTTTTTTCGAGTACCATACTGTGTAATATTGCTTTATTTACCAGAACCTTT
 Entsa: GTTCTGCACTACAACTGCGGTTTTTCTGCGTACCGTACTGCGTAATATTGCTCTATTACCCGACCCCTTT

Sathy: CTGGATAATAGCGCAGCTATTACCCTAAGCGCTTTGCCATATACGTCATCGTTGGCATGCCCCGTTTGC
 Citsp: CTGGATAATCATCGCAGTATTACCCTAATTACTTTGCCATATACGTCATCATTTGGAATGACCCGACTGA
 Citfr: CTGGATAATTACCGCGTATTACCCTATGAACCTTTGTTAATACGTCATCATTTGGAATGACCCGTTTGA
 Ecoli: CTGGATAATCATCGCAGTATTACCCTAAGCACCTTTGCCAATACTGTCATCGTTGGCAGTCCCCGCTGA
 Entsa: CTGGATAATTTTTGCAGCTATTACCCTATCCATCTTGGCTAATACCTGTCATCGTTCCCGTACCCGCTCTGA

Sathy: TCAATATACGCAAAGTTATAATTCCTGCTGCTGCTGACTTTTCGCCGATTATTTCCCTCCTTCTTGTGAAA
 Citsp: GCAATATACGCAAATTATAAGCTCCTGATTGCTCACTTTTGGCCCGTTACTTCCACCTTCTTGTGAAA
 Citfr: TCAATATATGCAAAGTTATATGATCCGCTGCTGCTTGTGTTTCGCTCGATTACAGAACCTTCTTGTGAAA
 Ecoli: TCAATATATGCAAAGTTATAATCTCCTGCTGCTGCTCACTTTTGGCCCGTTGCTACTACCTTCTTGTGCAA
 Entsa: TCGATCCAGGCAATATTGTAAGTCCCTGATTGATCAACTCTCGCTCTGTTGCTGCAACCATCTGGGAAA

Sathy: TAACGCAACAATAGTTTTGATCCCTTCTGGCGTACTCTGGCACTATTATCCGTGCCGACTTGACCAATAAT
 Citsp: CTACCGACAAAAGTTTAGAGCCCTCCTGGCGCATCTTTCGCACTATTATTCGTGCCCACTTGACCAATAAT
 Citfr: TGACTGCAACAATCTTCGAGCCCTCCTGGCGGGTATTTGCACTGTTTCGCACTGCGCAACTTGACCAATAAT
 Ecoli: CAACCGCCAAAAGTTTAGAGCCCTCCTGGCGGTAACGAGCACTATTATAGTCCAGCTTGACCAATAAT
 Entsa: CGACTGCAACAAGTTTTGACCCCTTCTGGCGGAATCTGAGCGTCAATTAATACGCCCTGTTGACCAATAAT

Sathy: GGCGCGCTGATTAAATGAAGACTTCTTAATTCATTACCGCAAAGTT-ATACTCTGAACGA--GCCAG
 Citsp: GGCTGCGCTGATTAAATGAAGACTTCTTAATTCATTACCGCAAAGTT-ATATTTCGGAATGCAGCGCTAA
 Citfr: GGCTGCGCTGATTAAATGAAGACTTCTTAATTCATTACCGCAAAGTT-ATATTCTGAATTA--GCTAA
 Ecoli: GGCTGCGCTGATTAAATGAAGACTTCTCAATTCATTACCGCGAAGTT-ATATTCTGAATTA--GCTAA
 Entsa: GGCTGCGCTCATTTAATGATGACCCGCTTAATTCCTTAACCGCAAAGTTTATATTTCCTATGG---CAA

Sathy: ATCATAAATTTGT---CGCGGTTCGAATCCAGGCGCACCCAGTATGTCAACATCATAAATAACAATTTG
 Citsp: ATCATAAATTTGT---TGCGGAAGCAATCCAGGCGCACCCAGTACTGTTAAACATCATAAATAACAATTTG
 Citfr: ATCATAAATTTGTATTCGCGGTTCGAATCCAGGCGCACCCAGTATGTAAACATCATAAATAACAATTTG
 Ecoli: ATCATAAATCTGC---TGCGGTTCGAATCCAGGCGCACCCAGTATGTAAACATCATAAATAACAATTTG
 Entsa: ATCAGTATTTAGC---CGCGGTTCGAATCCAGGCGCACCCAGTATGTAAACATCATAAATAACGATGTC

Start *csqB*

SDS

Sathy: TTTTTCATGCTGTACCCCTGGACCTGGTCGTACATCGAGAAAAT-----TATCTATTACCTTGTTAG
 Citsp: TTTTTCATGTTGTACCCCTGGACCTGGTTCGCACATCGAGAAAATAACGTTCTCATCAATTTCTCTGTTAA
 Citfr: TTTTTCATGTTGTACCCCTGGACCTGGTTCGTACATGAAGTTAAATTAATTACCACCTCAATTTGTTGTTAA
 Ecoli: TTTTTCATGTTGTACCCCTGGACCTGGTTCGTACATTTAAGAAATTAATCA-TTTCACCTGGTTGTTAA
 Entsa: TTTTTCATGTTGTACCCCTGGACCCGCGC--TACCTGAAACACCCCTG-----TTCGTAATTCGTGTTAA

csqBAC TS

-10

-35

Sathy: CGACATGCGTTT-TTTGTTAACGCGTTCGTTACGATGAAGAGTATGTCCTTGGAACATTTTTTAATACTC
 Citsp: CGCTAAACGTAA-TTTGTTAACGCGCGTTACGATGAAGAGTATGTCGCGGAAACATTTTAATAACTC
 Citfr: CATGACTTACA--TTTGTTAACGCGCAGTTACGATGAAGAGTATGTCGCGGAAACATTTTAATAACTC
 Ecoli: CGCAACCTGTAT-TTTGTTAACGCGTTCGTTACGATGAAGAGTATGTCGCGGAAATTTTTTAATAACTC
 Entsa: -ACGACTCGTTTTTTTGTTAACGCGTTCGTTACGATGAAGAGTATGTCCTTGGAACATTTTAATAACTC

Sathy: ACCCAACGCGTGTATTTTGTATTTAAGCTTCATACCAAAGTGCTAATAA---AACGATAGCCATGTGAT
 Citsp: ACCCGCCAGTGGTATTTTATATTTTCCTCACACCAAAGTACTAAACAGGGCAGGATAGCC-TGTAT
 Citfr: ACCCGCCAGTTGTATTTTATATTCAGATTACCCCAAAGTACTAATTAACA-GCGAACATACCCGTTAC
 Ecoli: ACCCGCGCGTTGTATTTTCTTTTTCAGTTACATACCAAAGTATTAACCCACGTAAATACGC-TGTAT
 Entsa: ACCCGCGTGGCTTATTTTATTTCTCAGGTCACCACAAAGTCGTAATTTGC--AGAAAAATA-CATTAC

Sathy: TTTTTATAATTGATTTTGGCCACAGAAGATAGTGTATCGCGCACCTAAAAAATGA-AGTGTGGTGTGT
 Citsp: TTGCGCTTATTTTATTTTCTTAC-GATTATCG-GTAGTCTTTTCTCGCCGTCA-GTCAGCAGGCTGT
 Citfr: AGCTCTGGATTTTCAATTTCTTTTAAACCAAGTG---AATCAATTTTATGAGTAACAAA-AAAACGCGT
 Ecoli: CTACGCAAAAAAATAATTTGTTTT--CTTTTAA---ATCTCCGTTTCCGCTATCA-AAAAGCACCAGAC
 Entsa: ACAGGCTGGTTTTAAATTTT--TTATAGAATATTTATGCGCGTTGTGTCGTAACAGACGACAGCCTGCC

Sathy: GTTATGCGCGCATGGCGATGTTCTTATGCTTCCCATCTGGGCAATACCCACAAGACGTGACACACTTCG
 Citsp: AAAGTGG-ACCTTCCAGGCTATGTTCTACGCTCGAAAGAGAGAGATCATCAAGTCGTGACAAGCCCTCG
 Citfr: TTTCCGC-GTTTCTCGGCGCTCGTACGAGGTACTTCGATAGTTAGCATTGCAAGTCGTGACAAGCGTCA
 Ecoli: AGTCATT--CTTCTTGCCCGTCTGCTATTGCTGC--CATATGCTTTCGCCACAAGCCGTGACAAACCTCG
 Entsa: ACGCGTT--CCTGCGCTTGTTTAAACGTAACGGCAAGATAGCATTTCCTCATCACGTGACACAGGACG

Sathy: TTTTTTTTGTCTT-----TGTGCTGTCCAGGTAAATGCCACGTC-CAAATTTTAAGAAAA-AATAAAAT
 Citsp: TTTTTTTTCGTATCAAAATGCACGACGCGCGGAATGTCATCAC-TGAGCAATTACCACACTGATGAAGT
 Citfr: TTTTTTTTCTATCTAAATTTGTCCAACCTTAAGTAAGACGAAAAAGACGGAATTCATTAGAA--ATCAAAA
 Ecoli: TCTTTTTGCAGTAAATAATTTGTCCACGGAGGTGTGGAGAAAAA-CAAGAACGTTTTTACAT-GACGAAAG
 Entsa: TTTTTTTCTTAAGCCAGAGAGAGAGACATAATGGCTTGGGAAG-TATCAGTTACTCATAC--CAAAGC

Sathy: CAAACACATAACATATAATAATTAAATGATTAAAAATCAATGAATTATATAATTTGTATGATTTTTTAA
 Citsp: ---ACCAGAGCGAATTTGTGTTAT--TACTTTAAATTCAAATTAATTAATAATTTGTATGATTTTTTAA
 Citfr: ---ACCATCTAAGCATAAATTTAA--CTCTTAATCAATCAATACCATATATAATTTGTATGATTTTTTAA
 Ecoli: --GACTACACGAAATATTTTTTA---TATGCAATTATAGTAAGTTATCAACCATTTGTATGATTTTTTAA
 Entsa: TTAAAGTCTCCAAAATAAAAATTTAA--GACATAAAATCAACCGGTTAAATAAATTTGTATGATTTTTTAA

Sathy: ATCTATGCAATAACACCGAAATGTACAACCTTTACTATCAAATCTAAACTTCAAAAAACCCAAAAACAAAC
 Citsp: ATCTGTGCAATAACCGCTGGATGTACAACCTTTACTATCAAATCTAAACTTAAAAAAGCCTTAAGATAAC
 Citfr: ATCTATGCAAGTATCGCCAAAATGTACAACCTTTACTATCAAATCTAAACTTCTAAAAACCCAAAAATCAC
 Ecoli: AATTGTGCAATAAAAAACAAATGTACAACCTTTCTATCATTTCTAAACTTAATAAAACCTTAAGGTTAAC
 Entsa: ATCTGTGCACGCCTATTTATATGTACAACCTTTCAATCAAATAACAAATTCAAAAACAGCAATATCAC

-35 -10

Sathy: ATTTTAATAT-ATATTTTACATTTGTTTACAAGTTTAACACTTGTGTTTAAAGATTGTAAATGGCTAGATT
 Citsp: AAATTAATAT-ATATTTTACATTTCCGTTACATGTTTAACACTTGTGTTTAAAGATTGTAAATGGCTAGATT
 Citfr: ATTTTAATAT-ATAAATTTACATTTCTGTAACATGTTTAACACTTGTGTTTAAAGATTGTAAATGGCTAGATT
 Ecoli: ATTTTAATAT-AACGAGTTACATTTAGTTACATGTTTAACACTTGTGTTTAAAGATTGTAAATGGCTAGATT
 Entsa: AAATTAATATTGATTTTACATCTTGTTACATGTTTAACACTTGTGTTTAAACTTCGTAAAGCTAGATT

Sathy: GAAAAACAGTTAAAGT--ATTTTCGTAATATTTT--CTCTTCTCGATAATGGGCTATTTCA--ACCC
 Citsp: GAAATCAGTTGTAGTTC-ATTTGTATTAATATTTTGC--CCCGTTCGGGCTGATTC-TTATTTTACTACAC
 Citfr: GAAATCAGTTGAAGTCCCATTGTTTAAATATTTTCA-CCCGTTCGGCTCGATATTTTATTTCT---AC
 Ecoli: GAAATCAGATGTAATCC-ATTAGTTTAA-TATTTTAC-CCATTTAGGGCTGATTTATTTACTACA-----C
 Entsa: GAAATTAGCTGTACGAA-ATTGGTTTAA-TATTTACTCTCCCTGTGACGTTATGTTCTGATTTCT--ACAC

csqD TS

Sathy: ACAGCAGTGCAACATCTGTCAGTACTTCTGGTGCCTTTAT--TTTA-TGGGGGCAGCTGTCAGATGTGCG
 Citsp: ACAGCAGTGCAACATCTGTCAGTACTTCTGGTGCCTCA---TTTC-TGCAGGCAACTGTCAGATGTGCG
 Citfr: ACAGCAGTGCAACATCTGTCAGTACTTCTGGTGCCTCTAT--TTTAGTAGAGACAGCTGTCAGGTGTGCG
 Ecoli: ACAGCAGTGCAACATCTGTCAGTACTTCTGGTGCCTCTAT--TTTA---GAGGCAGCTGTCAGGTGTGCG
 Entsa: ACAGCAGTGCAACATCTGTCAGTACTTCTGGTGCCTTCCCTCTTTTTCAGGAGGGCAGCTGTCAGGTGTC-CA

SDS Start csqD

Sathy: AT---TAAAAAAGGGAGTTTCATCATGTTTAATGAAGTCCATAGTAGTCATGGTCAACACACTATTGTT
 Citsp: AC---TAAAAA--GTGG-GTTTCATCATGTTTAATGAAGTCCATAGTATTCATGGTCAACACACTATTGTT
 Citfr: AC---TAAAAA--GTGGAGTTTCATCATGTTTAATGAAGTCCATAGTATTCATGGTCAACACTATTGTT
 Ecoli: ATCAAATAAAAAAGCGGGGTTTCATCATGTTTAATGAAGTCCATAGTATTCATGGTCAACACTATTGTT
 Entsa: AA---AATAA--GTGGGTTTCATCATGTATAATGAAGTCCATAGTTTACATGGTCAACACTATTGTT

Sathy: GATCACAAGGCCATCTCTGCAAGCTACGGCATTATTGCAACATTTAAAGCAATCGCTGGCCATAACCGGA
 Citsp: GATCACCAAACCATCTCTGCAAGCTACAGCATTATTGCAACATTTAAAGCAATCTCTGGCCCTCTCCGGA
 Citfr: GATCACTAAACCATCTCTGCAAGCAACTGCGTTATTACAGCATTTTAAAGCAATCGCTGGCGTTAACCGGA
 Ecoli: GATCACTAAATCTCTCTTGCAGGCGACAGCTCTCTTCAGCACCTTAAAGCAATCGCTGGCAATTACAGGA
 Entsa: GATCACAAGGCCATCTCTGCAAGCTACAGCTTTATTACAAATTTAAAGCAATCTTTATCATTTGAACGGG

Sathy: AAACTGCATAATATTCAAAGTTCTCTGGAAGATATCTCGGCCGGTTCGATTGTTTTAAATGGATATGATGG
 Citsp: AAACTGCATAATATTCAAGTTCTCTCGGATGATATCTCTCCAGCTGCATTGTTTTAGTTCGATATGATGG
 Citfr: AAACTACATAATATTCAAAGTTCTCTCGGATGATATTCTCTCCAGCTGCATTGTTCTACTGGACATGATGG
 Ecoli: AAATTAACATAATATTCAAAGTTCTCTCGACGATATCTCTTCAGGCTCTATTATTCTCTCGATATGATGG
 Entsa: AAAATGCATAATATTCAAAGTTCTTTTGATGATATTCGGCCTGGCAGCATCATTCTGTTTGATATGATGG

Sathy: AAGCGGATAAAGAGCTTATCCACTATTGGCAGGATAAATTAAAGCCGCAAAAAACAATAATATAAAACATT
 Citsp: AAGCGGATAAAAAAGCTCATCCATTACTGGCAGGATAAATTAAAGTCGGAAAAACAATAATTTAAAGACGTT
 Citfr: AAGCGAGCAAAAAAGCTGATCCATTACTGGCAAGATAAATTGAGCAGAAAAACAACAATATAAAGACGTT
 Ecoli: AAGCGGATAAAAAAGCTTATCCATTATTGGCAGGATACTTTGAGCAGAAAAACAACAATATCAAAATATT
 Entsa: AAGCTGATAAAGAGCTTATCCATTACTGGCAAGATAAATTAAAGCAGAAAAACAATAATATCCCGCTGTT

Sathy: ATTGTTAAATACCCCTGACGATTATCCCTACCGTGAAATTGAAAACTGGCCTCATATTAAACGGCGTGTTT
 Citsp: ATTGTTGAACACGCCCGATGATTATCCCTACCGGGATATTGAAAACTGGCCGCATATCAATGGCGTGTTT
 Citfr: ATTGTTGAATACCCAGATGATTATCCCTATCCGGGATATTGAAAACTGGCCGCATATCAATGGCGTATTTC
 Ecoli: GTTCTTAATACGCCCTGAAGATTACCGGTACCGCGACATTGAAAACTGGCCTCATATCAACGGCGTGTTT
 Entsa: ATTTATGAACACTCCTGATGAATACCTTTTCAGAGATTATTGAAAGCTGGCCGCATATCAATGGCGTGTTC

Sathy: TACGCTACTGAAGACAGGAACACGTGGTCAGCGGATTACAGGGTATCTGCGTGGCGAATGCTATTTT
 Citsp: TACGTAGCGGATGACGAAGAGCGTGTCTGTAACCGGTTTCAAGGGATCCTGCGGGGAGAAATGTTACTTCT
 Citfr: TACGCAACAGAGATGAGCAGCGTGTCTGTCAGCGGATTGCAAGGCGTGTGCGTGGCGAATGCTACTTTT
 Ecoli: TATTCCATGAGGATCAAGAACGTTGTGTAATGGGTTGCAAGGCGTCTGCGCGGCGAATGCTACTTTA
 Entsa: TACGTCAGTGAAGAGAAAGGCCGGTGGTAGAGGTCGTCAGGGCATATTGCGCGGAGAGTGTTATTTCT

Sathy: CACAAAAATTAGCCAGTTACCTGATTACGCCACTCAGGAATTACCGGTACAACAGCACCGAGTCCGCATT
 Citsp: CACAGAACTGGCCAGTTATCTGATCACTCACTCAGGTAATTATCGGTACAACAGCAGTGAGTCCAGCCCT
 Citfr: CACAAAAGCTCGCCAGCTACCTGATCAGCATTCCGGGAACCTACCGGTATAACAGCACCGAGTCCGGCATT
 Ecoli: CGCAAAAGCTTGCCAGCTACCTGATTACGCATTCCAGGTAATATCTGTTATAACAGCACCGAATCAGCCCT
 Entsa: CGCAAAAGCTGGCCAGCTACCTCATCAGCATTCCGGTAACTACCGGTATAACAGTTCCGAATCCCGGCT

Sathy: ACTCACTCATCGCGAAAAAGAGATCCTCAATAAGTTACGTATTGGTGCCTCTAATAATGAAATCGCGAGG
 Citsp: CCTGACTCATCGCGAAAAAGAGATCCTCAATAAGCTCGGTATCGGCGCCTCTAATAATCGAAATCGCACGT
 Citfr: ACTTACGCACCGCTGAAAAAGAGATCCTTAATAAACTCGGTATTGGCGCCTCAATAATGAAATCGCGCGT
 Ecoli: CCTTACTCATCGGAAAAAGAGATCCTCAATAAGCTCGGTATCGGCGGCTCTAATAACGAGATCGCTCGT
 Entsa: GCTCAGCACCGTGAATAAGAGATCCTCAACAACTACGCATTGGTGCCTCAATAATGAAATCGCCCGT

Sathy: TCGCTATTTATCAGCGAGAAACACGGTTAAGACACATCTTTATAATCTTTTCAAAAAGATAGCTGTCAAAA
 Citsp: TCACTGTTTATCAGTGAAAACACGGTCAAAACACATCTTTATAATCTTTTCAAAAAGATAGCTGTCAAAA
 Citfr: TCACTATTTATTACTGAAAATACGGTTAAACACCATCTTTATAATCTTTTCAAAAAGATAGCTGTCAAAA
 Ecoli: TCGTTGTTTCATCAGCGAAAATACGGTTAAACACCATCTTTATAATCTTTTCAAGAAGATAGCCGTAAAAA
 Entsa: TCGTTATTTATCAGCGAAAATACGGTTAAGACACCTTTATAATCTTTTCAAGAAGATAGCTGTTAAAA

Stop *csgD* Start *csgE*

Sathy: ATCGCACCCAGGCAGTTTCATGGGCAAAACGATAATCTCAGGCGGTAAGGCCATGAAACGCTATCTGACCT
Citsp: ACCGTACCCAGGCAGTTTCGTGGGCAAAATGATAACCTCAGGCGATAACGCCATGAAACGCTATTTAACCT
Citfr: ATCGTACGCAGGCAGTCTCGTGGGCAAAATGATAACCTCAGGCGATAAAGCCATGAAACGCTATTTGTCT
Ecoli: ACCGACACAAGCGTTTCTGGGCAAAACGATAACCTCAGGCGATAAAGCCATGAAACGTTATTTACGCT
Entsa: ATCGAACTCAGGCTGTTTCATGGGCAAAACGATAACCTCAGGCGTTAATCATGAAGGCCACGTTGAGTT

Sathy: GGATTGTAGCAGCAGAGTTACTGTTGCTACCGGAAACCTGCATGCCAATGAAGTTGAAGTCGAGGTTCC
Citsp: GGCTTGCAGCGGCGCAGTTGCTGTTGCTGCCAGCAGCAGCAGGCT-----GTAGAACTTGAAGTTCC
Citfr: GGATTGTGGCAGCAAAATTTGTTCCCTTGCTGCCGGGAATCTACACGCTGCT---GTAGAGGTGGAGGTTCC
Ecoli: GGATTGTGGCGGCAGATTCTCTGTTGCTGCCAGGGAATCTTCACGCC-----GTTGAGGTAGAAGTCC
Entsa: GGATCGCCGCAAGCAGGTTTCTTCTGCTGCTGCCAGGGAACCTGCAGGCC-----GTCGAGGTGGAAGTTCC

Sathy: CGGATTGTTAACCACCATTACCGTCTCTTCGATAGGACATGAATTCATCGTGCATTACCGACAAATGG
Citsp: TGGGCTCTTAACCTGACCACACGGTTTCGTCTATTGGCCACGATTTTATCGTGCCTTACCGACAAATGG
Citfr: CGGACTGTTGACTGACCACACTGTCTCTTCTATTGGCCATGATTTTATCGTGCCTTTAGTGACAAGTGG
Ecoli: GGGATTGCTAACTGACCATACTGTTTCATCTATTGGCCATGATTTTACCGAGCCTTTAGTGATAAATGG
Entsa: CGGATTGTTAACCTGACCATTACAGTCTCATCGATCGGCAAGTTTTACCGGCGCTTCAGTGATAAATGG

Sathy: GAAAGCGAATACACCGGCAATCTGACCATTAATGAAAGACCCAGTGC
Citsp: GAAAGTGATTATCCAGGCAATTTGACCATCAATGAGCCACCCAGTGC
Citfr: GAAAGTAAGTACACAGGAACTTAACCATTAATGAAAGGCCAGTGC
Ecoli: GAAAGTCACTATACGGGTAACCTTAACGATTAATGAAAGGCCAGTGC
Entsa: GACAGTACCTACACCGGTAATTTAACAATCAACGAGCCGCCAGTGC

Abkürzungenleutung: Sathy (*S. Typhimurium*), Citsp (*Citrobacter spp.*), Citfr (*C. freundii*), Ecoli (*E. coli*), Entsa (*E. sakazakii*), SDS (Shine Delgarno Sequenz), TS (Transkriptionsstart).

VIII. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Zell- und Immunbiologie an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig und des Microbiology and Tumorbiology Center (MTC)/Karolinska Institute in Schweden für die sehr schöne kollegiale Arbeitsatmosphäre bedanken.

Insbesondere gilt mein Dank:

Priv. Doz. Dr. U. Römling für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in ihrem Labor und das interessante Forschungsprojekt. Für die intensive Betreuung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Meinem Mentor **Prof. Dr. J. Wehland** für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung.

Prof. Dr. D. Jahn und **Prof. Dr. N. Käufer** für die Übernahme des Koreferates meiner Dissertation.

Dr. M. Nimtz und seiner Arbeitsgruppe für die unermüdliche Durchführung und stetige Optimierung der Glukose-Bestimmung im GC/MS sowie des AgfA-Nachweises am MALDI/TOF-MS

Dr. H. Lünsdorf, Dr. M. Rohde und **E. Müller** für die stets engagierte Bereitschaft die Proben im EM zu untersuchen und für die großartigen EM-Bilder.

P. Hagendorff (GBF) und **Helena Lönnqvist** (MTC) für die DNA-Sequenzierungen.

Ein Großer Dank an meine Arbeitskollegen: **Ulrich Gerstel** für die wissenschaftlichen Diskussionen, für die exzellente Zusammenarbeit im Labor und die Durchsicht meiner Arbeit. Für die leidenschaftliche Unterhaltung über Landwirtschaft (inzwischen weiss ich nicht was ich mehr mag: Schafe oder Pferde), für diskussionshaften Momente beim Angeln, und für die vielen handwerklichen Hilfen. **Werner Bokranz** für die gute Zusammenarbeit im S2-Labor und das gemütliche Brezel-Frühstück in der Kantine. **Andreas Kresse** für die große Hilfe in wissenschaftlichen Fragen und für die vielen Diskussionen im Labor: Danke Man! **Dinesh Siramulu** für die Hilfe im Englisch und für das leckere, scharfe Curri-Hähnchen. **Marcus Geese** für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Hilfe am Fluoreszenzmikroskop. **Anja Arms** für die gute Zusammenarbeit und für das Wohnungsmanagement in Stockholm. **Maïke Rochon** für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die sehr angenehmen Diskussionen verschiedenster Themen: Gruesse an Norbert! **Kader Abdul, Roger Simm**: ja, ja this is not easy! und **Xiaoda Wang, Amanda Mühlmann** für die vielen freundlichen Ratschläge und Hilfen in vielen Fällen: Danke Amanda! **Marlies Konradt, Petra Hagendorff, Reiner Munder, Frau Possin** (GBF) **Gregor Blomquist, Katrin Pütsep** und **Jenny Karlsson** (MTC) für die großen technischen Hilfen und die vielen angenehmen Unterhaltungen.

Ein besonderer Dank gilt: **meinen Eltern** und **meinen Brüdern** für all die Geduld, die sie mir gegenüber gezeigt haben und für die moralische und finanzielle Unterstützung.

Ein liebevoller Dank gilt: **meiner Frau Mimi** und **meinem Sohn Albion**, die mich immer unermüdlich motiviert und unterstützt haben. Ich liebe euch!

IX. Lebenslauf

Xhavit Zogaj

Tyska Bottens väg 48 nb

16841 Stockholm

Schweden

Tel.: 0046736291564

E-Mail: xhavit.zogaj@mtc.ki.se

Geburtsdatum	01.01.1971
Geburtsort	Terpeze, Kosovo
Familienstand	Verheiratet
Dissertation	08/1999 Doktorand im Bereich Zell- und Immunbiologie an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig. 02/2002 Fortsetzung der Doktorarbeit am Microbiology and Tumorbiology Center / Karolinska Institute, Schweden.
Disputation	6 September 2004 an der Technischen Universität „Carolo Wilhelmina“ Braunschweig.
Studium	10/1990-07/1991 Student der Biologie an der Universität von Prishtina, Kosovo. 10/1993-08/1999 Studium der Biologie an der Technischen Universität Braunschweig.
Abschluss	Diplom-Biologe
Auszeichnungen	10/2000 DAAD-Preis (Deutscher Akademischer Austauschdienst – Preis) verleiht von der Technischen Universität Braunschweig.
Deutschkurse	01/1992-09/1992 an der Volkshochschule (Goethe-Institut), Braunschweig; 09/1992-03/1993 an der Technischen Universität Braunschweig.
Schulbildung	Grundschule: 09/1978-06/1986 Gymnasium: 09/1986-06/1990
Schulabschluß	Abitur
Sprachen	Albanisch Deutsch Englisch Schwedisch (Grundkenntnisse)